Rec'd PCT/PTO 27 JUN 2005

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

10/521313

In re application of

Docket No: Q85741

Joon Youb LEE, et al.

Appln. No.: 10/521,313

Group Art Unit: not yet assigned

Confirmation No.: 9295

Examiner: not yet assigned

Filed: January 14, 2005

For: HER-2 NEU DNA VACCINE HAVING ANTI-CANCER ACTIVITY

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

Mark L. Hayman
Registration No. 51,793

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860
WASHINGTON OFFICE
23373
CUSTOMER NUMBER

Enclosures: Korea 10-2003-0038012

Date: June 27, 2005

In re appln of Joon Youb LEE, et al
USSN 10/521,313
Filed January 14, 2005
Conf. No. 9295

대 한 민 국 특 허 청
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

출 원 번 호 : 10-2003-0038012
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 06월 12일
Date of Application : JUN 12, 2003

출 원 인 : 주식회사 팬제노믹스
Applicant(s) : PanGenomics Co., Ltd.

2005 년 06 월 14 일

특 허 청
COMMISSIONER

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.06.12

【발명의 국문명칭】 항암효과를 갖는 Her-2/neu DNA 백신

【발명의 영문명칭】 Her-2/neu DNA VACCINE HAVING ANTI-CANCER ACTIVITY

【출원인】

【명칭】 주식회사 팬제노믹스

【출원인코드】 1-2001-027094-7

【대리인】

【성명】 이현실

【대리인코드】 9-1999-000366-5

【포괄위임등록번호】 2001-038590-8

【대리인】

【성명】 장성구

【대리인코드】 9-1998-000514-8

【포괄위임등록번호】 2001-038588-8

【발명자】

【성명의 국문표기】 이준엽

【성명의 영문표기】 LEE,Joon Youb

【주민등록번호】 740417-1001628

【우편번호】 135-110

【주소】 서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 76-503

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김동현

【성명의 영문표기】 KIM,Dong-Hyeon

【주민등록번호】 780627-1009412
【우편번호】 142-106
【주소】 서울특별시 강북구 미아6동 1267-329호
【국적】 KR

【발명자】
【성명의 국문표기】 정연석
【성명의 영문표기】 CHUNG,Yeonseok
【주민등록번호】 740807-1543114
【우편번호】 135-110
【주소】 서울특별시 강남구 압구정동 한양아파트 10-303
【국적】 KR

【발명자】
【성명의 국문표기】 장선영
【성명의 영문표기】 CHANG,Sun-Young
【주민등록번호】 751004-2792914
【우편번호】 156-010
【주소】 서울특별시 동작구 신대방동 602-15 5층
【국적】 KR

【발명자】
【성명의 국문표기】 이경철
【성명의 영문표기】 LEE,Kyung-chul
【주민등록번호】 750610-1055615
【우편번호】 137-049
【주소】 서울특별시 서초구 반포본동 반포아파트 111-203
【국적】 KR

【발명자】
【성명의 국문표기】 강창율
【성명의 영문표기】 KANG,Chang-Yuil

【주민등록번호】 541128-1105113
【우편번호】 137-060
【주소】 서울특별시 서초구 방배동 대우 효령아파트 104-502
【국적】 KR
【우선권 주장】
【출원국명】 KR
【출원종류】 특허
【출원번호】 10-2002-0041764
【출원일자】 2002.07.16
【증명서류】 첨부
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국 미생물 보존센타
【수탁번호】 KCCM-10393
【수탁일자】 2002.06.26
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국 미생물 보존센타
【수탁번호】 KCCM-10394
【수탁일자】 2002.06.26
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국 미생물 보존센타
【수탁번호】 KCCM-10395
【수탁일자】 2002.06.26
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국 미생물 보존센타
【수탁번호】 KCCM-10396
【수탁일자】 2002.06.26
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】	24			
【서열목록의 전자문서】	첨부			
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이현실 (인) 대리인 장성구 (인)			
【수수료】				
【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	52	면	52,000	원
【우선권주장료】	1	건	26,000	원
【심사청구료】	12	항	493,000	원
【합계】	600,000 원			
【감면사유】	중소기업			
【감면후 수수료】	313,000 원			
【첨부서류】	1.요약서·명세서(도면)_1통 2.기타첨부서류[우선권증명서류{2002년 7월 16일자로 특허청에 기제 출된 것을 원용함]_1통			

【요약서】

【요약】

본 발명은 세포내 영역이 제거된 인간 Her-2/neu 유전자를 포함하는 항암효과를 갖는 플라스미드, 이를 유효성분으로 하는 암 예방 및 치료용 조성물과 백신에 관한 것으로, 본 발명의 Her-2/neu DNA 백신은 우수한 항암효과를 가지므로 암 수술 후 전이를 감소시키는 치료용 백신 및 유전적으로 암 발생 위험이 있는 사람을 위한 예방용 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1a

【명세서】

【발명의 명칭】

항암효과를 갖는 Her-2/neu DNA 백신{Her-2/neu DNA VACCINE HAVING ANTI-CANCER ACTIVITY}

【도면의 간단한 설명】

<1> 도 1a 및 1b는 각각 pNeu 플라스미드의 제조과정 (1a) 및 이를 이용한 마우스의 면역일정 (1b)을 나타낸 것이고,

<2> ECD: 세포외 영역, TM: 막통과 영역, ICD: 세포내 영역

<3> 도 2는 각각 pTV2 (A), pNeu$_{TM}$ (B), pNeu$_{ECD}$ (C), pNeu$_{TM}$-gDs (D) 및 pNeu$_{ECD}$-gDs (E) 플라스미드에 의해 유도되는 Her-2/neu 특이적인 항체반응을 나타낸 것이고,

<4> 백색 히스토그램: 대조군 항체, 흑색 히스토그램: 시험군 혈청

<5> 도 3은 각각 PBS (A)와 pNeu$_{ECD}$ (B), pNeu$_{TM}$ (C), pCK$_{ECD}$ (D) 및 pCK$_{TM}$ (E) 플라스미드에 의해 유도되는 Her-2/neu 특이적인 항체반응을 나타낸 것이고,

<6> 백색 히스토그램: 대조군 항체, 흑색 히스토그램: 시험군 혈청

<7> 도 4는 각각 pTV2 (A), pNeu$_{TM}$ (B) 및 pNeu$_{ECD}$-gDs (C) 플라스미드로 면역화한 마우스 혈청을 공초점 주사현미경으로 관찰한 결과이고,

<8> 도 5는 각각 pTV2 (A), pNeu$_{TM}$ (B), pNeu$_{ECD}$ (C), pNeu$_{TM}$-gDs (D) 및 pNeu$_{ECD}$-gDs (E) 플라스미드에 의해 유도되는 세포독성 T 림프구 반응을 나타낸 것이고,

<9> 도 6은 각각 PBS (A)와 pNeu$_{ECD}$ (B), pNeu$_{TM}$ (C), pCK$_{ECD}$ (D) 및 pCK$_{TM}$ (E) 플라스미드에 의해 유도되는 세포독성 T 림프구 반응을 나타낸 것이고,

<10> 도 7a 및 7b는 pNeu 플라스미드에 의한 예방적 항암효과를 나타낸 것으로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her2-CT26 세포를 피하주사한 경우의 종양크기 (7a) 및 Her2-CT26 세포를 정맥주사한 경우의 마우스의 생존률 (7b)을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이고,

<11> 도 8a 및 8b는 pCK$_{ECD}$ 및 pCK$_{TM}$ 플라스미드에 의해 유도되는 예방적 항암효과를 나타낸 것으로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her2-CT26 세포를 피하주사한 경우의 종양크기 (8a) 및 Her2-CT26 세포를 정맥주사한 경우의 마우스의 생존률 (8b)을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이고,

<12> 도 9a 및 9b는 pNeu$_{ECD}$ 및 pNeu$_{ECD}$-gDs 백신 투여에 의해 유도되는 예방적 항암효과를 나타낸 것으로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her2-CT26 세포를 피하주사한 경우의 종양크기 (9a) 및 Her2-CT26 세포를 정맥주사한 경우의 마우스의 생존률 (9b)을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이고,

<13> 도 10a 및 10b는 pNeu$_{ECD}$ 및 pNeu$_{ECD}$-gDs 백신 투여에 의해 유도되는 암 치료효과를 나타낸 것으로서, 각각 Her2-CT26 세포를 1×10^{5}개 (10a) 또는 5×10^{5}개

(10b)로 정맥주사한 후 각 플라스미드를 투여한 마우스의 생존률을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이고,

<14> 도 11은 pCK_{ECD} 및 pCK_{TM} 플라스미드에 의해 유도되는 암 치료효과를 비교하여 나타낸 것이고,

<15> 도 12a 및 12b는 pCK_{TM}과 사이토카인 벡터의 병용투여 면역일정 (12a) 및 각각에 의해 유도된 세포독성 T 림프구 반응 (12b)을 나타낸 것이고,

<16> 도 13a 내지 13d는 pCK_{TM}과 사이토카인 벡터의 병용투여 후 예방적 항암효과를 비교하여 나타낸 것으로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her2-CT26 세포를 피하주사 및 정맥주사한 실험일정 (13a), 피하주사에 의해 생성된 종양크기 (13b, 괄호 안은 실험 마우스 중 종양이 생기지 않은 마우스의 비) 및 정맥주사한 경우의 마우스 생존률 (13c와 13d, 괄호 안은 실험 마우스 중 생존한 마우스의 비)을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이고,

<17> 도 14a 내지 14c는 pCK_{TM}과 사이토카인 벡터의 병용투여에 의해 유도되는 암 치료효과를 비교하여 나타낸 것으로서, 마우스에 Her2-CT26 세포를 정맥주사한 후 각 플라스미드를 투여한 실험일정 (14a) 및 마우스의 생존률 (14b와 14c, 괄호 안은 실험 마우스 중 생존한 마우스의 비)을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이고,

<18> 도 15a 내지 15d는 각각 Her-2/neu 유전자와 사이토카인 유전자를 동시에 발현하는 플라스미드의 제조과정 (15a) 및 상기 플라스미드에 의해 유도되는 예방적

항암효과를 나타낸 것으로서, 마우스에 각 플라스미드를 투여한 후 Her2-CT26 세포를 피하주사한 경우의 종양크기 (15b, 괄호 안은 실험 마우스 중 종양이 생기지 않은 마우스의 비) 및 정맥주사한 경우의 마우스 생존률 (15c와 15d, 괄호 안은 실험 마우스 중 생존한 마우스의 비)을 시간의 경과에 따라 나타낸 것이고,

<19> 도 16a 및 16b는 Her-2/neu 유전자와 사이토카인 유전자를 동시에 발현하는 플라스미드에 의해 유도되는 암 치료효과를 나타낸 것이다 (괄호 안은 실험 마우스 중 생존한 마우스의 비).

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<20> 본 발명은 인간 Her-2/neu DNA를 포함하고 항암효과를 갖는 플라스미드 및 이를 유효성분으로 하는 백신에 관한 것이다.

<21> Her-2/neu 유전자는 성장인자 수용체의 타입 I 군에 속하는 막관통 단백질로서 크기가 185 kDa인 티로신 키나아제를 암호화한다 (Akiyama, T., et al., *Science* 232: 1644-1646, 1986).

<22> Her-2/neu 단백질은 유방암이나 난소암과 같은 수종의 선암에서 과다발현되는데, Her-2/neu의 과다발현은 유방암 환자에서 단기 재발, 나쁜 예후와 상당한 관

련이 있으며, 과다발현 자체로도 암 발병과정뿐만 아니라 임상적인 경과에 직접적인 역할을 함이 알려져 있다 (Slamon, D. J., et al., *Science* 235: 177-182, 1987). 또한, Her-2/neu 특이적인 항체와 T 림프구도 유방암과 난소암 환자에서 발견되고 있다 (Kobayashi, H., et al., *Cancer Res*. 60: 5228-5236, 2000). 따라서, Her-2/neu 종양형성유전자는 이의 과다발현과 관련된 암에 특이적인 치료용 백신을 개발하기 위하여 좋은 표적으로 사용될 수 있다.

<23> 인간 Her-2/neu 유전자는 세포내 영역에 티로신 키나아제 활성을 가지고 있고, 상기 유전자의 과다발현 자체만으로도 세포의 비정상적인 분열이 촉진되어 발암의 가능성이 높아진다. 따라서, 세포내 키나아제 활성부위에 돌연변이를 일으켜 활성을 억제하거나, 세포외 영역 혹은 세포내 영역을 제거한 분자 또는 전체 분자를 백신에 이용하여 발암 가능성을 억제하고자 하는 시도가 있었다 (Wei, W. Z., et al., *Int. J. Cancer* 81: 748-754, 1999).

<24> 플라스미드는 비교적 생산하기 쉬우면서 단백질도 아니고 바이러스성 피막도 없어 백신의 임상적인 효과를 저해하는 중화항체를 생성시키지 않아 안전하므로 암 관련 항원을 표적으로 하는 항암 백신의 개발에 유용한 벡터로 이용될 수 있다.

<25> 전임상 암 모델에서 랫트 Her-2/neu (Chen, Y., et al., *Cancer Res*. 58: 1965-1971, 1998) 또는 인간 Her-2/neu (Pilon, S. A., et al., *J. Immunol*. 167: 3201-3206, 2001) 유전자 DNA 백신은 Her-2/neu를 과다발현하는 암세포에 대해 예방적인 효과를 나타내었다.

<26> 이렇게 Her-2/neu DNA 백신에 의해 Her-2/neu를 발현하는 암세포에 대한 항

암효과를 보인 사례는 그 전에도 있었지만 성공적인 치료 효과를 보고한 경우는 없었다. Her-2/neu 플라스미드에서 항원이 발현되기까지 상당한 시간이 소요되어 항암효과가 늦게 나타나기 때문에 치료효과를 보기가 어려우며, 더욱이 유방암 세포는 비교적 성장속도가 빠르다. 따라서, 일부 Her-2/neu 치료용 백신에 대한 연구는 DNA와 사이토카인을 분비하는 암세포를 함께 이용하거나 (Chen, S. A., et al., *Clin Cancer Res*. 6: 4381-4388, 2000), 수상돌기세포를 이용하는 경우 (Chen, Y., *Gene Ther*. 8: 316-323, 2001)가 많았다.

<27> 이에 본 발명자들은 암 치료에 효과적으로 이용할 수 있는 Her-2/neu DNA 백신을 제조하기 위해 계속 연구를 진행하던 중, 매우 우수한 항암 치료 및 예방효과를 갖는 인간 Her-2/neu 유전자 DNA 백신을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<28> 본 발명의 목적은 우수한 항암효과가 있는 인간 Her-2/neu 발현 플라스미드를 제공하는 것이다.

<29> 본 발명의 다른 목적은 상기 플라스미드를 유효성분으로 하는 암의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

<30> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 플라스미드를 유효성분으로 하는 암의 예방 및 치료용 백신을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<31> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 세포내 영역이 제거된 인간 Her-2/neu 유전자를 플라스미드 pTV2 또는 pCK에 삽입하여 제조된, 항암효과를 갖는 플라스미드를 제공한다.

<32> 세포내 영역이 제거된 인간 Her-2/neu 유전자는 바람직하게는 서열번호: 2의 염기서열을 가지며, 이 유전자를 생체내에서 발현효율이 높은 플라스미드 pTV2 (Lee, S. W. et. al., *J. Virol*. 72: 8430-8436, 1998) 또는 pCK (기탁번호: KCCM-10179)에 삽입하여 본 발명의 플라스미드를 제조할 수 있다. 바람직하게는, Her-2/neu 유전자 자체의 신호 펩타이드 서열을 포함하는 경우에는 pTV2 또는 pCK의 *Kpn*I과 *Xba*I 부위에, Her-2/neu 신호 펩타이드 서열 대신에 허피스 심플렉스 타입 I 당단백질 D (gD)를 포함하는 경우에는 pTV2 또는 pCK의 *Asc*I과 *Xba*I 부위에 인간 Her-2/neu 유전자를 삽입하여 본 발명의 플라스미드를 제조할 수 있다.

<33> 본 발명에 따라 세포내 영역이 제거된 인간 Her-2/neu 유전자를 포함하는 플라스미드는 다음과 같은 잇점을 기대할 수 있다. 우선, Her-2/neu의 세포내 키나아제 영역을 제거하여 이에 의해 유발되는 비정상적인 성장신호 전달을 차단함으로써 정상세포가 암세포로 변할 수 있는 기회를 제거하여 Her-2/neu의 발암성을 없앨 수 있다. 또한, 표피세포 성장인자 수용체군과 펩타이드 서열이 매우 유사한 세포내 영역을 제거함으로써 자가면역반응의 위험성을 피할 수 있다. 발암성과 자가면

역반응의 위험성을 배제하기 위해 세포내 영역을 제거한 Her-2/neu를 이용하여 DNA 백신을 시도한 선행 연구가 있었으나 (Chen, Y., et al., *Cancer Res*. 58: 1965-1971, 1998), 이들은 우수한 항암효과를 나타내지 못했다. 반면, 본 발명의 플라스미드는 항체반응과 세포독성 T 림프구 반응 모두를 잘 유도하여 우수한 항암효과를 나타내며, 특히 전이암에 대해서도 치료효과를 나타낸다.

<34> 본 발명의 상기 플라스미드로부터 Her-2/neu 유전자의 막관통 영역을 추가로 제거하여 서열번호: 3의 염기서열을 갖는 유전자를 포함하는 플라스미드를 제조할 수 있는데, 막관통 영역의 제거로 인해 단백질이 세포외로 분비되는 효과가 있다.

<35> 본 발명의 플라스미드는 또한 면역반응을 보다 잘 유도할 수 있도록 인간 Her-2/neu 유전자 고유의 신호서열을 외래의 신호서열로 치환하여 제조할 수도 있는데, 외래의 신호서열로는 인간 면역결핍바이러스 (HIV) 타입 I gp160의 발현과 분비를 용이하게 하는 것으로 알려진 허피스 심플렉스 타입 I 당단백질 D (gD) 신호서열이 바람직하다.

<36> 본 발명의 플라스미드 중 바람직한 것들은 세포내 영역이 제거된 Her-2/neu 유전자를 pTV 및 pCK 벡터에 각각 삽입하여 제조된 플라스미드 $pNeu_{TM}$ 및 pCK_{TM}, 이들로부터 Her-2/neu 유전자의 막관통 영역을 제거한 플라스미드 $pNeu_{ECD}$ 및 pCK_{ECD}, 및 플라스미드 $pNeu_{TM}$ 및 $pNeu_{ECD}$에서 Her-2/neu 유전자 고유의 신호 펩타이드 서열을 허피스 심플렉스 바이러스 타입 I의 당단백질 D (gD) 신호서열로 치환한 플라스미드 $pNeu_{TM}$-gDs 및 $pNeu_{ECD}$-gDs이다.

<37> 상기 플라스미드 $pNeu_{TM}$, pCK_{TM}, $pNeu_{ECD}$ 및 pCK_{ECD}는 2002년 6월 26일자로 한국 미생물 보존센타에 각각 기탁번호 제KCCM-10393호, 제KCCM-10396호, 제KCCM-10394호 및 제KCCM-10395호로서 기탁하였다.

<38> 이들 플라스미드를 BALB/c 마우스에 투여하면 신호 펩타이드 서열에 따라 Her-2/neu 특이적인 IgG 항체를 유도하는 양상이 달라지는데, 구체적으로 $pNeu_{TM}$와 $pNeu_{ECD}$를 투여한 마우스의 혈청은 Her-2/neu 특이적인 IgG 항체의 역가가 매우 높은 반면, $pNeu_{TM}$-gDs와 $pNeu_{ECD}$-gDs의 경우는 대조적으로 낮다. 한편, 모든 플라스미드들은 Her-2/neu에 대한 강한 세포독성 T 림프구 반응을 유도한다. 이에 이러한 플라스미드를 이용하여 Her-2/neu를 발현하는 암세포를 제거하는데 있Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구와 항체의 상대적인 중요성을 살펴본 결과, 모든 플라스미드들은 소량의 암세포에 대해서는 완벽하게 거부반응을 보이며, 암의 예방 및 치료 모델에서도 $pNeu_{ECD}$와 $pNeu_{ECD}$-gDs의 항암효과는 유의적인 차이를 보이지 않음을 알 수 있다. 반면, 치료 모델에서 암세포의 양을 늘릴 경우에는 $pNeu_{ECD}$만이 통계적으로 유의적인 항암효과를 나타낸다. 이러한 결과는 암 예방을 위해서는 강한 세포독성 T 림프구 반응으로도 충분하지만, 암의 치료를 위해서는 세포독성 T 림프구와 항체 모두가 필요하다는 것을 뒷받침해 준다.

<39> 또한, 인간 Her-2/neu 유전자의 항암효과는 사이토카인 유전자의 병용투여에 의해 향상될 수 있으며, 특히 GM-CSF, IL-18 또는 IL-15 유전자와의 병용투여가 우

수한 효과를 보이고, 인간 Her-2/neu 유전자와 사이토카인 유전자를 동시에 발현하는 플라스미드 역시 암전이에 의한 사망 지연 및 억제를 유발하는 예방적 항암효과를 나타내어 실제 임상에 사용할 때 더 큰 효과를 발휘할 수 있음을 확인하였다.

<40> 한편, 플라스미드 pCK_{TM}과 pCK_{ECD}는 플라스미드 $pNeu_{TM}$ 및 $pNeu_{ECD}$ 와 거의 동등한 효과를 보이며, 이로부터 항암 치료용 백신으로서 본 발명의 플라스미드들이 임상적으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

<41> 본 발명의 플라스미드를 포함하는 조성물은 암 수술 후 전이를 감소시키는 치료용 백신 및 유전적으로 암 발병 위험이 있는 사람을 위한 예방용 백신으로서 유용하게 사용될 수 있다.

<42> 전형적으로, 이러한 백신은 용액 또는 현탁액으로서 주입가능하게 제조되며, 주입 전에 액체 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고형물로 제조될 수 있다. 상기 제조물은 또한 에멀전화될 수 있다. 활성 면역원성 성분은 종종 약제학적으로 허용되고, 활성성분과 양립가능한 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제로는 염수, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 혼합물 등이 사용될 수 있다. 또한, 필요에 따라, 백신은 소량의 보조 물질, 예컨데 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충제 또는 백신의 효과를 증진시킬 수 있는 보조제를 함유할 수 있다.

<43> 백신은 통상적으로 비경구적으로, 예컨데 피하내 또는 근육내 주입에 의해 투여된다. 다른 방식의 투여에 적합한 추가적인 제형으로 좌약을 포함하며, 일부 경우에는 경구투여용 제형을 포함한다. 좌약에 있어서, 전형적인 결합제 및 담체

로는 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세라이드를 포함할 수 있다. 이러한 좌약은 0.5 내지 10%, 바람직하게는 1 내지 2%의 활성성분을 함유하는 혼합물로부터 제조될 수 있다. 경구투여용 제형은 이러한 일반적으로 사용되는 부형제, 예컨데 약제 등급의 만니톨, 락토오스, 녹말, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로오스, 마그네슘 카보네이트 등을 포함한다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 지속 방출 제형 또는 분말의 형태이며, 10 내지 95%, 바람직하게는 25 내지 70%의 활성성분을 함유한다.

<44> 본 발명의 플라스미드는 중성 또는 염 형태로서 백신으로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산부가염 (펩티드의 유리 아미노기로 형성됨)을 포함하며, 이는 무기산, 예를 들면 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예를 들면 아세트 옥살산, 타르타르산, 만델산 등으로 형성된다. 유기 카르복실기로 형성된 염은 또한 무기염, 예를 들면 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 제2철 히드록사이드 및 유기염, 예를 들면 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도될 수 있다.

<45> 백신은 투여 제형과 양립가능한 방식으로 치료학적으로 효과적이고 면역원적인 양으로 투여된다. 투여될 양은 예를 들어, 면역반응을 증가시킬 수 있는 개인의 면역 시스템의 능력을 포함한 처리된 시험체에 의존적이며, 요구되는 보호 정도는 환자의 Her-2/neu의 수준에 의존적이다. 활성성분으로서 본 발명의 플라스미드의 적합한 투여량은 사람을 포함하는 포유동물에 대해 하루에 0.2 내지 10 mg/kg (체중), 바람직하게는 4 내지 5 mg/kg (체중)의 양으로 1일 1회 또는 수회로 나누

어 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여할 수 있다.

<46> 백신에 대한 보조효과를 달성하는 방법으로는 염수로 완충된 포스페이트 중에 0.05 내지 0.1% 농도로 함유되는 알루미늄 히드록사이드 또는 포스페이트 (알루미늄), 0.25% 농도로 함유되는 당의 합성 중합체 (카르보폴)와의 혼합물과 같은 제제, 열 처리에 의한 단백질 응집물을 사용하는 것을 포함한다. 알부민에 대한 (Fab) 항체 처리된 펩신, 박테리아 세포, 예를 들면 C. 파르붐 (*C. parvum*) 또는 감마-네거티브 박테리아의 내독소 또는 리포폴리사카라이드 성분과의 혼합물, 생리학적으로 허용되는 오일 비히클, 예를 들면 만니드 모노-올레이트 (아라셀 A; Aracel A) 중의 에멀젼 또는 블록 치환체로 사용된 20% 용액의 퍼플루오로카본 (플루오졸-DA)과 에멀젼과의 재활성화에 의한 응집이 또한 이용될 수 있다.
이외에도, DDA (디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드), QuilA, RIBI, 모노포스포릴 리피드 A (MPL) 및 마루밀 디펩티드 (MDP) 등이 사용가능하다. 다른 적합한 보조제로는 알루미늄 히드록사이드, 알루미늄 포스페이트 (Adju-Phos), 칼슘 포스페이트, 무라밀 디펩티드 유사체가 있다.

<47> 보조효과를 달성하는데 있어서의 또 다른 바람직한 가능성으로는 림포카인, 예를 들면 INF-γ, IL-2 및 IL-12 또는 합성 INF-γ 유도체, 예를 들면 상기 언급된 보조제와 혼합된 폴리 I:C와 같은 면역 조절물질을 사용하는 것이 포함된다.

<48> 본 발명의 플라스미드를 보조제와 혼합시키는 이유는 세포 면역반응을 효과적으로 활성화시키는데 있다. 그러나, 이러한 효과는 또한, 다른 방법, 예를 들면 비병원성 미생물 중의 백신에서 효과적인 항원 발현에 의해 달성될 수 있다. 이러

한 미생물의 널리 공지된 예로는 미코박테리움 보비스 BCG (*Mycobacterium bovis* BCG)가 있다. 비병원성 미생물로 박테리아, 예를 들면 미코박테리움, 살모넬라 (*Salmonella*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 및 에스케리시아 (*Eschericia*) 등을 사용하는 것이 바람직하다. 특히, 바람직한 비병원성 미생물은 미코박테리움 보비스이다.

<49> 본 발명의 생 (living) 백신은 본 발명에 따라 형질전환된 비병원성 세포를 배양하고, 이러한 세포를 백신에 대한 배지로 이동시키고, 선택적으로 담체, 비히클 및/또는 보조제를 첨가함으로써 제조될 수 있다.

<50> 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<51> **참조예 1: 세포주와 실험동물**

<52> Her-2/neu를 발현하는 인간 유방암 SK-BR3 세포주 (ATCC HTB-30)와 마우스의 결장선암종 세포주인 CT26 (ATCC CRL-2639)은 ATCC (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 인간 유방암 세포주 SK-BR3 세포들은 10% 열불활성화 우태아혈청 (GIBCO, Gaithersburg, MD)과 1% 페니실린-스트렙토마이신 (GIBCO)이 함유된 RPMI 1640 배지 (BioWhittaker, Walkersvile, MD)에서 배양하였다. Her-2/neu를 발현하

는 이입세포 Her2-CT26 세포주는 인간 Her-2/neu를 암호화하는 cDNA (NCBI: M11730)를 CT26 세포에 이입하여 제조하였다. Her2-CT26과 CT26 세포들은 10% 열 불활성화 우태아혈청 (GIBCO, Gaithersburg, MD)과 1% 페니실린-스트렙토마이신 (GIBCO)이 함유된 IMDM (BioWhittaker) 배지에서 배양하였다.

<53> 5주령된 암컷 BALB/C 마우스들은 찰스리버사 (오사카, 일본)에서 구입하여 12시간 주/야 주기에서 22℃, 상대습도 55%를 유지하며 사육하였고, 사료와 물은 제한없이 공급하였으며, 전체 실험기간 동안 무균분리기에서 유지되었다.

<54> 참조예 2: 근육주사를 위한 DNA 플라스미드의 제조

<55> 플라스미드 $pNeu_{TM}$, pCK_{TM}, $pNeu_{ECD}$, pCK_{ECD}, $pNeu_{TM}$-gDs, $pNeu_{ECD}$-gDs 및 대조군 플라스미드 pTV2와 pCK로 각각 형질전환된 대장균 DH5α (*Escherichia coli* strain DH5α, Promega, Madison, WI, USA)를 LB 배지 (Difco, Detroit, MI)에서 배양하였다. 배양된 대장균 형질전환체로부터 엔도프리 퀴아젠 플라스미드-기가 키트 (Endofree Qiagen Plamid-Giga Kits, Qiagen, Chatsworth, CA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 플라스미드 DNA를 대량으로 분리·정제하였다. 이와 같이 분리·정제된 DNA를 침전시킨 다음 멸균 PBS에 2 mg/㎖의 농도로 현탁시키고 투여 일정에 따라 사용시까지 -20℃에서 보관하였다.

<56> 참조예 3: 유세포 분석 (Flow Cytometry, FACS)

<57> 혈청 중의 항체가 Her-2/neu 표면단백질과 반응하는지를 시험하기 위하여, SK-BR3, Her2-CT26 및 CT26 세포를 세포 스크레퍼 (cell scraper, Nunc, Naperville, IL)를 이용하여 배양플라스크에서 떼어냈다. 떼어낸 세포들을 RPMI 1640 배지, 2% 우태아혈청, 0.1% 소디움 아자이드가 함유된 완충용액으로 세척하였다. 각각 약 2×10^5개의 세포들을 혈청 또는 대조군 항체의 연속 희석용액과 함께 4℃에서 30분간 반응시켰다. 배양한 세포들을 다시 완충용액으로 3회 세척한 다음 마우스 IgG에 특이적인 FITC-접합 염소 단클론 항체 (Sigma)와 4℃에서 30분간 반응시켜 염색하였다. 염색된 세포들을 완충용액으로 2회 세척한 후 완충용액으로 재현탁하였다. 데이터에서 죽은 세포를 제외하기 위하여, 세포 현탁액에 1 ㎍/㎖ 프로피디움 아이오다이드 (Sigma)를 넣어 분석 전에 5분간 배양하였다. 프로피디움 아이오다이드 염색에서 음성으로 판정된 세포들만을 분류하여 종양 세포들에 대한 결합분석에 이용하였다. 유세포 분석은 PAS Ⅲi 유세포 분석기 (Partec GmbH, Munster, Germany)를 이용하여 실시하였다.

<58> **참조예 4: 항 Her-2/neu 항체에 대한 공초점 주사현미경 (Confocal microscopy) 분석**

<59> 약 1×10^5개의 SK-BR3 세포들을 1 mg/㎖ 폴리-L-라이신이 도포된 Lab-Tek 챔버 커버글래스 (Nunc, Napervile, IL)에서 3일간 배양하였다. 세포들을 4% 파라포름알데히드를 함유한 PBS 완충용액으로 실온에서 10분간 처리하여 고정하고,

DMEM (BioWhittaker, Walkersvile, MD) 배지로 3회 세척한 후, 1% 염소-글로불린을 함유한 DMEM 배지로 4℃에서 1시간 동안 차단하였다. 차단용액에서 1:50 희석 마우스 혈청으로 4℃에서 8시간 동안 배양하고 세척한 후 R-피코에리트린-접합 염소 항마우스 면역글로불린 2차 항체 (Southern Biotech, Birmingham, AL)와 실온에서 30분간 반응시켰다. 슬라이드를 겔/마운트 배지 (Gel/Mount media, Fisher)에 넣은 후 공초점 주사현미경 (Leica TCS-SP laser scanning microscopy)으로 관찰하였다.

<60> 참조예 5: DNA 면역화

<61> 모든 마우스에 멸균 PBS 100 ㎕에 용해된 100 ㎍의 플라스미드 DNA를 뒷다리 2개에 나누어 근육주사하였다. 주사부위는 부피바카인-HCl (bupivacaine-HCl, ASTRA, Westborough, MA)로 마우스마다 50 ㎕씩 근육주사하여 마취하였다. 치료용 백신에 대한 매일의 면역화에서는 부피바카인-HCl을 첫 번째 면역화 직전에 한 차례만 전처리하였다. 혈청은 정해진 시간에 취하여 항 Her-2/neu 항체의 존재 여부를 측정하였다.

<62> 참조예 6: 크롬-방출 분석

<63> 마우스로부터 비장을 적출하여 비장세포를 얻고 마이토마이신 C (Sigma)를 처리한 Her2-CT26 세포와 6일 동안 배양하였다. 2 $\times 10^6$개의 Her2-CT26 또는 CT26

종양 표적세포들을 200 μCi의 $Na^{51}CrO4$를 포함한 200 ㎕의 생리식염수에서 37℃로 90분간 배양하여 ^{51}Cr을 표지하였다. 세포에 표지되지 않은 ^{51}Cr은 RPMI 1640 배지로 4회 세척하여 제거하였다. 6일 동안 배양한 후 단계별로 희석한 마우스 비장세포들을 10% 우태아혈청을 함유한 RPMI 1640 배지에 현탁하여 바닥이 둥근 미세적정판 (round-bottom microtiter plate)에서 ^{51}Cr이 표지된 10,000개의 표적세포들과 혼합하고 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 상기 배양액을 100 ㎕씩 취하여 섬광계측기 (Packard, Minaxi Auto Gamma 5000 Series)로 계측하였다. 용해된 백분율은 하기 반응식 1에 의해 계산하였다:

【반응식 1】

<64> 특이적 용해 (%) = 100 × [(실험군의 cpm - 자연 용해군의 cpm) / (완전 용해군의 cpm - 자연 용해군의 cpm)]

<65> 완전 용해군의 cpm은 ^{51}Cr-표지 표적세포들에 5% 트리톤-X (Sigma) 10 ㎕를 가하여 얻은 배양액을 측정하여 결정하였다. 각 집단은 이중 (duplicate)으로 시험하였다. 이때, 자연 용해군의 cpm은 비장세포나 트리톤-X를 가하지 않고 동량의 배지만을 가하여 얻은 배양액을 측정하여 결정하였다.

<66> 참조예 7: 종양 공격

<67> 멸균 PBS에 현탁한 Her2-CT26 세포들을 옆구리에 피하주사하거나 정맥주사하여 마우스들을 공격하였다. 종양들은 측경기 (caliper)를 이용하여 3차원으로 측정하였고, 부피는 하기 **반응식** 2에 의해 계산하였다:

【반응식 2】

<68> 종양부피 = (너비 × 길이 × 두께)㎣ × $(1/2)^3$ ×4π/3

<69> 촉진으로 종양을 발견하기 위하여 일주일에 두 번씩 동물들을 관찰하였다. 심한 통증, 호흡곤란 및 운동장해를 나타내는 마우스는 희생시켰다.

<70> **실시예 1: Her-2/neu를 발현하는 플라스미드의 제작**

<71> 전체의 인간 Her-2/neu 유전자를 암호화하는 cDNA (**서열번호: 1**)를 pRc/CMV (Invitrogen Life technologies)의 *Hin*dIII와 *Xba*I 부위에 삽입하여 완전한 형태의 Her-2/neu 플라스미드 (9.6 Kb)를 제조하였다.

<72> Her-2/neu의 세포내 영역 및 막관통 영역없이 Her-2/neu의 세포외 영역만을 포함하는 플라스미드 $pNeu_{ECD}$ 및 pCK_{ECD}는 **서열번호: 4**의 NF6 시발체 및 **서열번호: 5**의 NSR1 시발체와 주형으로 상기에서 제조된 완전한 형태의 Her-2/neu 플라스미드를 사용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR) 생성물을 만든 후 플라스미드 pTV2 (Lee, S. W. et. al., *J. Virol.* 72: 8430-8436, 1998)와 pCK (Lee Y., et. al., *Biochem Biophys Res Commun.* 272: 230-235, 2000; 기탁번호: KCCM-10179)의 *Kpn*I과 *Xba*I의

위치에 각각 삽입하여 제조하였다. 이때, PCR 반응은 94℃에서 2분 동안 변성시키고, 94℃에서 15초, 55℃에서 30초 및 68℃에서 3분 30초로 이루어진 반응을 모두 25회 반복한 후 72℃에서 7분 동안 반응시켰다.

<73> 또한, Her-2/neu의 세포내 영역없이 세포외 영역과 막관통 영역을 포함하는 플라스미드 pNeu$_{TM}$과 pCK$_{TM}$은 **서열번호**: 6의 NF5 시발체와 **서열번호**: 7의 NRM2 시발체를 이용하는 것을 제외하고는 상기와 동일하게 PCR을 실시하여 얻은 PCR 생성물을 pTV2와 pCK의 *Kpn*I과 *Xba*I의 위치에 각각 삽입하여 제조하였다 (도 1a).

<74> 이어서, Her-2/neu의 세포내 영역과 막관통 영역없이 Her-2/neu의 세포외 영역만을 포함하며 Her-2/neu 유전자의 신호서열 대신 허피스 심플렉스 바이러스 타입 I형 당단백질 D (gD)의 신호서열을 포함하는 플라스미드 pNeu$_{ECD}$-gDs는 **서열번호**: 6의 NSF2 시발체와 **서열번호**: 5의 NSR1 시발체를 이용하는 것을 제외하고는 상기와 동일하게 PCR을 실시하여 얻은 PCR 생성물을 pTV2 벡터의 *Pst*I-*Asc*I 부위에 gD의 신호서열이 클로닝되어 있는 발현벡터 pTV2-gDs의 *Asc*I과 *Xba*I의 위치에 삽입하여 제조하였다. 또한, Her-2/neu의 세포외 영역과 막관통 영역을 포함하며 Her-2/neu 유전자의 신호서열 대신 gD의 신호서열을 포함하는 플라스미드 pNeu$_{TM}$-gDs은 **서열번호**: 9의 NF3 시발체와 **서열번호**: 7의 NRM2 시발체를 이용하는 것을 제외하고는 상기와 동일하게 PCR을 실시하여 얻은 PCR 생성물을 pTV2-gDs의 *Asc*I과 *Xba*I의 위치에 삽입하여 제조하였다 (도 1a).

<75> 실시예 2: Her-2/neu DNA 백신에 의한 Her-2/neu 특이적인 항체의 유도

<76> 상기 실시예 1에서 제작된 다양한 pNeu 플라스미드 DNA가 Her-2/neu 특이적인 항체를 유도할 수 있는지를 다음과 같은 방법으로 시험하였다. 참조예 1에서와 같이 준비된 각각의 마우스에 투여 계획에 따라 참조예 2에 따라 준비된 100 ㎍의 플라스미드 DNA를 3회 근육주사하였다 (도 1b). 각 그룹 중 일부의 마우스는 비장을 적출하여 Her-2/neu 특이적 세포독성 T 림프구 반응을 측정하였으며, 나머지 마우스에는 Her-2/neu를 발현하는 암세포를 투여하여 항암 면역정도를 측정하였다.

<77> 첫 번째 주사하기 전과 세 번째 주사 후 7일이 지난 뒤에 마우스로부터 혈청을 얻었다. 혈청 중에 존재하는 항체가 유방암 세포주인 SK-BR3 세포와 결합하는 정도를 참조예 3과 같이 유세포 분석기 (flow cytometry)로 측정하여 혈청 중에 존재하는 Her-2/neu 특이적인 항체의 역가를 계산하였다. pNeu$_{TM}$, pNeu$_{TM}$-gDs, pNeu$_{ECD}$ 또는 pNeu$_{ECD}$-gDs을 접종한 모든 마우스의 Her-2/neu 특이적인 항체의 역가를 측정하였으며, Her-2/neu에 결합력이 없는 대조군 항체의 경우와 비교하여 인간 유방암 SK-BR3 세포주와의 결합에 의한 평균 형광 세기의 이동이 나타나는 혈청의 최대 희석배수를 구하였고, 이를 하기 표 1에 나타내었다.

【표 1】

<78>

pTV2 (n=5)	pNeu$_{TM}$ (n=5)	pNeu$_{ECD}$ (n=5)	pNeu$_{TM}$-gDs (n=5)	pNeu$_{ECD}$-gDs (n=5)
<50	12800	12800	800	<50
<50	12800	12800	50	<50
<50	3200	12800	<50	<50
<50	12800	12800	800	<50
<50	3200	12800	50	<50

<79> 그 결과, 상기 표 1에서 보듯이 혈청 중의 Her-2/neu 특이적인 항체 IgG의 역가는 $pNeu_{ECD}$ > $pNeu_{TM}$ > $pNeu_{TM}$-gDs > $pNeu_{ECD}$-gDs = pTV2 순서로 나타났다. 플라스미드 DNA를 접종하기 전의 마우스로부터 얻은 혈청은 Her-2/neu 특이적인 결합력을 나타내지 않았다. 또한, 대조군 벡터인 pTV2를 접종한 마우스에서 얻은 혈청의 경우에도 1:50의 희석배율에서 Her-2/neu 특이적인 항체에 의한 결합력이 나타나지 않았다 (도 2의 A). 반면, $pNeu_{TM}$ 또는 $pNeu_{ECD}$을 접종한 마우스의 경우에는 높은 Her-2/neu 특이적인 IgG 역가를 나타냈으며, 혈청을 1:800으로 희석한 경우에 있어서도 평균 형광 세기가 폭넓게 이동하였다 (도 2의 B 및 C). 이와는 대조적으로 $pNeu_{TM}$-gDs 또는 $pNeu_{ECD}$-gDs을 접종한 경우에는 매우 낮은 정도의 IgG 역가를 나타냈으며, 혈청을 1:50으로 희석한 경우에도 구분하기 어려울 정도의 매우 낮은 평균 형광 세기의 변화만을 측정할 수 있었다 (도 2의 D 및 E). 플라스미드 pCK_{ECD} 와 pCK_{TM}를 동일한 방법으로 3회 주사한 후 10일째에 얻은 혈청을 1:400으로 희석한 경우에도 평균 형광 세기가 넓게 이동하여 Her-2/neu 특이적 항체가 잘 유도되었음을 확인하였다 (도 3).

<80> 또한, 공초점 주사현미경을 이용하여 참조예 4와 같이 $pNeu_{TM}$ 또는 $pNeu_{ECD}$-gDs로 면역화한 마우스 혈청 중의 Her-2/neu 특이적인 항체의 존재를 확인하였다.

pNeu$_{TM}$으로 면역화한 마우스 혈청 (도 4의 B)의 경우에는 대조군 벡터인 pTV2 (도 4의 A) 또는 pNeu$_{ECD}$-gDs (도 4의 C)로 면역화한 마우스 혈청과 비교해 볼 때, SK-BR3 세포 표면에 결합하는 Her-2/neu 특이적인 항체의 분포를 명확하게 관찰할 수 있었다. 이러한 사실은 도 2에 나타난 Her-2/neu 특이적인 항체의 역가와 일치하는 것이다.

<81> **실시예 3: Her-2/neu DNA 면역화에 의한 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응의 유도**

<82> 실시예 2에서와 같이 면역화에 사용한 pNeu 벡터의 종류에 따라 Her-2/neu 특이적인 항체반응에 차이가 크므로, 동일한 마우스에서 유도된 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응을 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

<83> 혈청 중의 Her-2/neu 특이적인 항체의 역가를 측정한 마우스로부터 세번째 접종이 끝난 후 2주 뒤에 비장세포를 얻었다. 비장세포를 마이토마이신 C로 처리한 인간 Her-2/neu를 발현하는 동일 종 기원의 마우스 이입세포인 Her2-CT26 세포와 6일 동안 함께 배양한 후에 4시간 동안 크롬-방출 실험을 통하여 CT26 또는 Her2-CT26 표적세포의 세포용해 정도를 측정하였다.

<84> 그 결과, pNeu$_{TM}$ (도 5의 B), pNeu$_{ECD}$ (도 5의 C), pNeu $_{TM}$-gDs (도 5의 D) 또는 pNeu$_{ECD}$-gDs (도 5의 E)로 면역화한 마우스로부터 얻은 비장세포는 대조군 벡터

인 pTV2 (도 5의 A)만을 접종한 대조군 마우스의 비장세포에서는 나타나지 않는 세포독성 T 림프구 의존적인 Her2-CT26 세포의 용해를 보였으며, Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응의 상대적인 세기는 $pNeu_{TM}$ > $pNeu_{ECD}$ > $pNeu_{TM}$-gDs > $pNeu_{ECD}$-gDs >> pTV2와 같다. pNeu 벡터들은 작용세포 : 표적세포 (effector : target) 비율 50:1에서 80~90%, 10:1에서 60~70%의 Her-2/neu 특이적인 세포용해도를 나타내고 있으며, pNeu 벡터들을 접종한 모든 마우스 비장세포에서 비슷한 정도를 보였다 (도 5의 B 내지 E). 반면, 어떤 그룹에서도 세포독성 T 림프구에 의한 CT26 세포의 용해는 관찰되지 않았다.

<85> $pNeu_{ECD}$와 $pNeu_{TM}$을 pCK 벡터로 치환시킨 pCK_{ECD}와 pCK_{TM}의 경우에도 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응을 분석하였다. 도 6에서 보듯이, pCK_{ECD}와 pCK_{TM} 플라스미드의 경우에도 $pNeu_{ECD}$와 $pNeu_{TM}$과 유사한 정도로 세포독성 T 림프구 반응이 잘 유도되고 있으며 세포외 영역 (ECD)만 있는 경우보다는 막관통 영역까지 포함하고 있는 경우 (TM)가 좀더 우수한 것으로 확인되었다.

<86> 즉, 모든 Her-2/neu를 발현하는 플라스미드는 강한 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응을 보이며, 이러한 반응은 신호 펩타이드 서열 및 벡터에 관계없이 나타났다. 그러나, 신호 펩타이드 서열에 따라 현저히 다른 Her-2/neu 특이적인 항체반응을 나타내었으며, 이러한 결과는 수 차례에 걸친 동일한 실험을 통하여 확인되었다.

<87> 실시예 4: Her-2/neu DNA 백신에 의한 예방적 항암효과 분석

<88> Her-2/neu를 발현하고 있는 동일 종 기원의 마우스 암세포주인 Her2-CT26에 대한 항암 면역효과를 BALB/c 마우스에서 측정하였다. 우선 마우스에 피하주사 또는 정맥주사를 통해서 각각 피하 암 또는 폐전이 암이 형성되는 정도를 조절하기 위해서 적정 실험을 통해 주사할 최적의 암세포 수를 결정하였다. 5×10^4개 이상의 Her2-CT26 세포를 피하주사 또는 정맥주사한 경우 피하 암 또는 폐전이 암이 형성되었다. 오랜 생존이 Her-2/neu 플라스미드 DNA 간의 항암 면역능력을 구분하는데 유리하므로 피하주사 또는 정맥주사에 의해 주입되는 세포의 수를 5×10^4개로 결정하였다. 각각의 마우스에 면역화 계획에 따라 3회에 걸쳐 100 ㎍씩의 플라스미드 DNA를 근육주사하였으며 (도 1b), 플라스미드 DNA의 3번째 접종이 끝나고 10일이 지난 뒤 각각의 마우스에 5×10^4개의 Her2-CT26 세포를 피하주사 또는 정맥주사로 투여하였다.

<89> 그 결과, 피하 암 모델에 있어서 대조군 벡터인 pTV2를 접종한 모든 마우스에서 뚜렷하게 암이 형성된 (도 7a) 반면, $pNeu_{TM}$, $pNeu_{TM}$-gDs, $pNeu_{ECD}$ 또는 $pNeu_{ECD}$-gDs를 접종한 그룹의 마우스에서는 암세포를 피하주사한 후에도 60일 동안 암의 형성이 완전히 억제되었다. 암전이 모델의 경우, $pNeu_{TM}$, $pNeu_{TM}$-gDs, $pNeu_{ECD}$

또는 pNeu$_{ECD}$-gDs를 접종한 그룹의 마우스들이 모두 암세포 정맥주사 후 생존하였다 (도 7b). 그러나, 암전이 모델에서 pTV2만 접종한 마우스는 57% (4/7)가 죽었으며, PBS만 접종한 마우스의 경우에는 모든 마우스가 생존하지 못하였다.

<90> 또한, pNeu$_{ECD}$와 pNeu$_{TM}$을 pCK 벡터로 치환시킨 pCK$_{ECD}$와 pCK$_{TM}$ 플라스미드의 경우에도 3회에 걸쳐 100 μg씩의 DNA를 근육주사하고 10일 후 1 $\times 10^6$개의 Her2-CT26 세포를 피하 또는 정맥주사하여 항암효과를 시험하였다. 그 결과, Her2-CT26을 피하주사한 경우에 PBS 그룹과 대조군 벡터인 pCK 벡터를 투여한 그룹에서는 모든 마우스에서 고형암이 성장하였지만 pCK$_{ECD}$와 pCK$_{TM}$ 플라스미드를 투여한 그룹의 경우에는 암이 전혀 형성되지 않은 마우스가 각각 62.5% (5/8)와 87.5% (7/8)로 나타나 암의 성장이 현저하게 억제되었음을 알 수 있다 (도 8a). 정맥주사한 경우에는 PBS 그룹과 pCK 벡터 그룹에서 17일 이내에 모든 마우스가 암세포의 폐전이로 사망하였으나 pCK$_{ECD}$와 pCK$_{TM}$ 플라스미드를 투여한 그룹의 경우에는 생존율이 현저히 증가하였다 (도 8b). pTV2 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 pNeu 플라스미드의 경우와 마찬가지로 pCK 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 플라스미드의 경우에도 뛰어난 항암효과가 있음을 확인하였다.

<91> **실시예 5: pNeu$_{ECD}$와 pNeu$_{ECD}$-gDs에 의한 항암 면역효과 비교**

<92> 본 실험에서는 피하주사하는 암세포의 수를 100배 (5 $\times 10^6$개/마우스) 증가

시키고, 정맥주사하는 암세포의 수를 40배 (2 $\times 10^6$개/마우스) 증가시켰다. 이때, 정맥주사는 정맥으로 투여된 암세포 수가 과다한 경우 혈관 폐쇄가 일어날 우려가 있으므로 세포의 수를 2 $\times 10^6$개 이상은 사용할 수가 없었다. 비교를 위해서 4가지 서로 다른 Her-2/neu 발현 플라스미드 중에서 Her-2/neu 특이적인 항체 역가의 차이가 가장 큰 $pNeu_{ECD}$와 $pNeu_{ECD}$-gDs를 선정하였다.

<93> 마우스는 면역화 계획 (도 1b)에 따라서 100 ㎍의 플라스미드 DNA를 3회 접종하고 10일 후, 각각의 마우스에 Her2-CT26 세포를 5 $\times 10^6$개 피하주사하거나 2 $\times 10^6$개 정맥주사하였다. 피하주사 모델에 있어서, pTV2를 주사한 모든 마우스 (8/8)에서 암이 발생하였으며, 암을 피하주사하고 19일이 지나기 전에 평균 암 부피가 2000 ㎣ 이상이 되었다. $pNeu_{ECD}$를 접종한 8마리 마우스의 경우에 23일째 평균 암 부피는 82.2 ㎣이었으며, $pNeu_{ECD}$-gDs를 접종한 8마리 마우스의 경우에는 67.9 ㎣이었다. $pNeu_{ECD}$ (p=2.9900e-8, the Students-t test) 또는 $pNeu_{ECD}$-gDs (p=2.8400e-8, the Students-t test)를 접종한 마우스의 경우 현저하게 암 성장이 억제되었지만, 각각의 플라스미드로 면역화한 두 그룹의 평균 암 부피의 차이는 통계적으로 유의성있는 차이를 보이지 않았다 (p=0.8684, the Students-t test). 암전이 모델의 경우, $pNeu_{ECD}$를 접종한 마우스는 40일까지 100% (8/8) 마우스에서, $pNeu_{ECD}$-gDs를 접종한 마우스는 88% (7/8) 마우스에서 암의 폐전이가 억제되었다. pTV2를 접종한

모든 마우스는 폐전이를 극복하지 못했다. 즉, pNeu $_{ECD}$ (p< 0.0001, Mantel-Haenszel test) 또는 pNeu$_{ECD}$-gDs (p<0.0001, Mantel-Haenszel test)로 처리한 경우 pTV2에 비해서 생존이 연장되었으나, pNeu$_{ECD}$와 pNeu$_{ECD}$-gDs 사이에는 유의성있는 차이를 보이지 않았다 (p=03173, Mantel-Haenszel test) (도 9a 및 9b).

<94> 실시예 6: 치료모델에서 Her-2/neu DNA 백신의 효과

<95> 먼저 암세포를 투여한 마우스에 DNA 플라스미드를 접종하는 치료모델에서 pNeu$_{ECD}$와 pNeu$_{ECD}$-gDs의 항암 면역효과를 다음과 같은 방법으로 비교하였다. 6주령된 마우스에 1 $\times 10^5$개 또는 5 $\times 10^5$개의 Her-2/neu 세포를 정맥주사한 후 4그룹으로 나누었다. 암세포를 접종하고 1시간 뒤에, 각각의 마우스에 pNeu $_{ECD}$ 또는 pNeu$_{ECD}$-gDs 100 ㎍을 근육주사하고, 동일한 DNA를 4일 동안 매일 접종하였다.

<96> 그 결과, 1 $\times 10^5$개의 암세포를 미리 접종한 경우, pNeu $_{ECD}$ 또는 pNeu$_{ECD}$-gDs를 접종한 모든 마우스가 40일 동안 폐전이를 극복하고 생존하였다 (도 10a). 그러나, pTV2만을 접종한 경우에는 63%의 마우스 (5/8)가 폐전이로 죽었으며, PBS만 접종한 경우에는 모든 마우스 (8/8)가 폐전이로 죽었다. pNeu$_{ECD}$와 pNeu$_{ECD}$-gDs는 pTV2와 비교할 때 유의성있는 정도로 생존율을 증가시켰으나 (p=0.0085, Mantel-

Haenszel test), $pNeu_{ECD}$와 $pNeu_{ECD}$-gDs 사이에는 유의성있는 차이가 없었다.

<97> 반면, 접종하는 암세포 수를 5배 증가시킨 경우 (5 $\times 10^5$개), $pNeu_{ECD}$를 접종한 마우스만이 pTV2를 접종한 마우스에 비하여 통계적으로 유의성있는 정도로 생존율이 증가하였고 (p=0.0237, Mantel-Haenszel test, 도 10b), $pNeu_{ECD}$-gDs를 접종한 마우스의 경우는 유의성있는 정도로 생존율이 증가되지 않았다 (p=0.4628, Mantel-Haenszel test). 그럼에도 불구하고 $pNeu_{ECD}$와 $pNeu_{ECD}$-gDs의 항암 면역효과 사이에 유의성있는 차이가 없다는 사실은 예방실험 모델의 결과와 일치하였다 (p=0.4263, Mantel-Haenszel test).

<98> 또한, $pNeu_{ECD}$와 $pNeu_{TM}$을 pCK 벡터로 치환한 pCK_{ECD}와 pCK_{TM} 플라스미드의 경우에도 2 $\times 10^5$개의 Her2-CT26 세포를 정맥주사하고 상기와 동일한 방법으로 DNA를 투여한 결과, PBS 그룹과 pCK 벡터 그룹의 경우에는 21일 이내에 모든 마우스가 암세포의 폐전이로 사망하였으나 pCK_{ECD}와 pCK_{TM} 플라스미드를 투여한 그룹의 경우에는 생존율이 현저히 증가하였다 (도 11). pTV2 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 pNeu 플라스미드의 경우와 마찬가지로 pCK 벡터 내에 Her-2/neu 유전자가 있는 플라스미드의 경우에도 상당한 항암 치료효과가 있음을 확인하였다.

<99> **실시예 7: 사이토카인 플라스미드의 제조**

<100> 상기 실시예 2 내지 6의 결과로부터 Her-2/neu의 세포내 영역을 제거한 DNA 백신을 마우스에 투여할 경우 항원 특이적인 항체와 세포독성 T 림프구가 생성되어 항암효과가 나타나는 것을 확인하였다. 특히, pCK_{TM}에서 항암효과가 뛰어나므로 이후의 Her-2/neu DNA 백신 실험은 pCK_{TM}으로 진행하였다. Her-2/neu DNA 백신의 항암효과를 더욱 높이기 위하여 사이토카인 유전자를 병용투여하는 방법을 고안하였다. 사이토카인의 병용투여는 항원 제공세포로의 항원 전달효율을 높이고 Th1 타입으로 면역반응을 유도하여, 실제 임상에서 보다 효율적으로 암을 제거할 수 있도록 할 뿐만 아니라 환자에서 항원에 대한 면역 내성 (immune tolerance)을 극복하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. 항원 제공세포로의 항원 전달효율을 높이는 사이토카인으로 과립구-대식세포 콜로니 자극인자 (Granulocyte-Marcrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF)와 FMS-유사 티로신 키나아제 3 리간드 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; Flt3L)를 선정하였고, Th1 타입으로 면역반응을 유도하는데 기여하는 사이토카인으로 초기 T 림파구 활성인자-1 (Early T lymphocyte activation-1; Eta-1), 인터루킨-12 (Interleukin-12; IL-12), 인터루킨-15 (IL-15)와 인터루킨-18 (IL-18)을 선정하여, 총 6종의 사이토카인 유전자를 pCK 벡터에 삽입하여 사이토카인 유전자 발현벡터를 제조하였다. GM-CSF는 수상세포 (dendritic cell), 대식세포 (macrophage), 단핵구 (monocyte), 과립구 세포 (granulocyte cell)의 성장과 분화에 관여하고, Eta-1은 타입-1 세포-매개 면역반응 유도에 중요한 사이토카인이며, Flt3L은 줄기세포 (Stem cell)의 성장, 분화에

관여하고, 특히 수상세포의 분화에 중요한 것으로 알려져 있다. 인터루킨군에 속하는 IL-12, IL-15 및 IL-18 역시 타입-1 세포-매개 면역반응 유도에 중요하며 대표적인 세포 면역반응 관련 사이토카인이다.

<101> **서열번호**: 10의 Eta-1, **서열번호**: 11의 IL-18, **서열번호**: 12의 IL-15 및 **서열번호**: 13의 Flt3L은 BALB/c 마우스의 비장에서 유래한 mRNA로부터 클로닝하였다. mRNA로부터 역전사효소 (reverse transcriptase; SUPERSCRIPTTMII RT, GIBCO BRL사)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA를 합성할 때, Eta1의 경우에는 **서열번호**: 14의 EF1 시발체와 **서열번호**: 15의 ER1 시발체를, IL-18의 경우에는 **서열번호**: 16의 18F1 시발체와 **서열번호**: 17의 18R1 시발체를, IL-15의 경우에는 **서열번호**: 18의 15F1 시발체와 **서열번호**: 19의 15R1 시발체를, Flt3L의 경우에는 **서열번호**: 20의 FF1 시발체와 **서열번호**: 21의 FR1 시발체를 각각 이용하여 중합효소연쇄반응 (PCR) 생성물을 만든 후 pCK 플라스미드의 *Kpn*I-*Xba*I 및 *Eco*RI-*Xba*I 위치에 삽입하여 pCK-Eta1, pCK-IL18, pCK-IL15 및 pCK-Flt3L을 제조하였다. GM-CSF와 IL-12는 클로닝하지 않고 pTV2-GMCSF (Cho, J. H. et al., *Vaccine* 17: 1136-1144, 1999)와 pTV2-IL12 (Ha, S. J., et al., *Nat. Biotechnol.* 20: 381-386, 2002)에 있던 것을 각각 pCK 벡터의 *Eco*RI-*Xba*I와 *Xho*I 위치에 삽입하여 pCK-GMCSF와 pCK-IL12를 제조하였다.

<102> **실시예 8: Her-2/neu DNA 면역화시 사이토카인 유전자의 병용투여에 의한 면역반응 및 항암효과 평가**

<103> Her-2/neu DNA 면역화시 사이토카인 유전자의 병용투여에 의한 면역반응 및 항암효과를 평가하기 위하여, BALB/c 마우스에 pCK_{TM}과 실시예 7에서 제조한 사이토카인 유전자 발현벡터를 각각 병용투여하여 pCK_{TM} 단독 투여에 의해 유도되는 면역반응과 비교하였다. 도 12a에 나타낸 바와 같이, pCK_{TM}과 사이토카인 유전자 발현벡터들을 각각 100 ㎍씩 3주 간격으로 2회 근육주사하고 3주 후 얻은 혈청으로부터 Her-2/neu 특이적인 항체반응을 측정하였고 Her2-CT26 세포를 이용하여 세포독성 T 림프구 반응을 측정하였다.

<104> 그 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, Her-2/neu 특이적인 항체 생성은 pCK_{TM}에 의해 유도되는 정도와 거의 유사하였다.

【표 2】

<105>

마우스	Her-2/neu 특이적인 IgG 항체 역가							
	pCK	pCK_{TM}	+IL-12	+IL-15	+IL-18	+Eta-1	+Flt3L	+GM-CSF
1	<50	3200	6400	6400	6400	3200	800	3200
2	<50	3200	3200	3200	6400	3200	3200	6400
3	<50	6400	6400	1600	6400	6400	800	6400
4	<50	3200	400	1600	12800	6400	1600	1600

<106> 또한, 세포독성 T 림프구 반응결과를 분석해 보면, 도 12b 및 하기 표 3에 나타난 바와 같이 pCK_{TM}에 의해 유도되는 Her-2/neu 특이적인 세포독성 T 림프구 반응과 비교하여 Eta-1과 Flt3L을 병용투여한 경우는 반응이 더욱 증가하였고, IL-18, GM-CSF 및 IL-15를 병용투여한 경우는 반응이 오히려 낮아졌다. 세포독성 T

림프구 반응의 경우 병용투여한 사이토카인의 종류에 따라 반응이 증가하거나 오히려 감소하는 등 경향이 다양하지만 pCK 벡터만 투여한 경우에 비해 전반적으로 높은 반응성을 나타내었다.

【표 3】

<107>

	작용세포 : 표적세포의 비율		
	3 : 1	10 : 1	30 : 1
pCK	5.5±0.69	8.8±3.16	20.3±5.43
pCK_{TM}	52.6±6.03	67.6±0.56	76.4±1.21
pCK_{TM}+pCK-IL12	34.6±5.67	59.3±8.82	79.3±6.99
pCK_{TM}+pCK-IL15	39.0±0.76	53.6±1.08	70.7±6.30
pCK_{TM}+pCK-IL18	21.8±1.44	38.8±4.53	47.7±2.55
pCK_{TM}+pCK-Eta1	59.5±9.01	88.7±11.07	96.2±4.52
pCK_{TM}+pCK-Flt3L	48.4±2.99	79.6±3.22	95.9±2.38
pCK_{TM}+pCK-GMCSF	34.6±12.96	50.6±15.56	64.3±13.38

<108> 마우스 모델에서 Her-2/neu DNA 면역화시 사이토카인 유전자를 병용투여하는 경우의 항암효과를 분석하였다. BALB/c 마우스에 pCK_{TM}과 사이토카인 유전자 발현 벡터들을 각각 100 ㎍씩 3주 간격으로 2회 근육주사하여 면역반응을 유도하고 3주 후 1×10^6개의 Her2-CT26을 피하주사하거나 정맥주사하였다 (도 13a). 그 결과, 피하주사에 의해 생성되는 고형암에 대한 예방적 항암효과는 pCK_{TM}에 의한 Her2-CT26 고형암의 성장 억제효과와 비교하여 사이토카인을 병용투여할 경우 억제효과가 더욱 증가하였다. 특히, pCK-GMCSF, pCK-IL15 및 pCK-Eta1의 병용투여가 가장 뛰어나고, pCK-Flt3L과 pCK-IL12의 병용투여가 다음으로 효과가 있었다 (도 13b).

전이암에 대한 예방적 항암효과를 보면, Her2-CT26 암세포 전이에 의한 사망 억제 효과는 pCK-GMCSF를 병용투여한 경우가 가장 뛰어나고 pCK-IL12를 병용투여한 경우가 다음으로 억제효과가 있었으나, 다른 사이토카인 유전자를 병용투여한 경우는 pCK_{TM}의 효과와 유사하였다 (도 13c 및 13d).

<109> pCK_{TM}과 사이토카인 유전자의 병용투여에 의한 암의 치료효과를 조사하기 위하여, 2×10^{5}개의 Her2-CT26 세포를 정맥주사한 후 이틀에 한번씩 총 3회 백신을 투여하였을 때 나타나는 항암효과를 분석하였다 (도 14a). 그 결과, 사이토카인 유전자를 병용투여한 경우는 대부분 pCK_{TM}만 투여한 경우보다는 전이암에 의한 사망 억제 및 지연효과가 우수하였다. 특히, IL-15, IL-18 및 Flt3L의 병용투여가 가장 뚜렷한 전이암 치료효과를 나타내었다 (도 14c 및 14d). 따라서, pCK_{TM}의 항암효과는 사이토카인 유전자의 병용투여에 의해 향상될 수 있으며, 특히 pCK-GMCSF, pCK-IL18과 pCK-IL15의 병용투여가 우수한 효과를 보였다.

<110> **실시예 9: Her-2/neu와 사이토카인을 동시에 발현하는 플라스미드의 제조**

<111> DNA 백신에서 사이토카인 유전자를 부형제 (adjuvant)로 이용하는 기존의 연구를 살펴보면 항원을 포함한 플라스미드 벡터와 사이토카인을 포함한 플라스미드 벡터 각각을 병용투여하기도 하지만, 최근에 들어서는 한 벡터에 항원과 사이토카인이 동시에 발현될 수 있도록 DNA 백신을 제조하는 경우가 많고 그 효과도 더욱

우수하다는 보고들이 있었다 (Barouch, D. H., et al., *J. Immunol.* 168: 562-568, 2002). 항원과 사이토카인이 동시에 발현될 수 있도록 하는 방법으로는 두개의 프로모터를 벡터에 채용하거나 HCV 바이러스로부터 유래한 IRES 서열을 이용하는 방법이 있다 (Ha, S. J., et al., *Nat. Biotechnol.* 20: 381-386, 2002). 본 발명에서는 CMV 프로모터 뒤에 Her-2/neu 유전자를 넣고, IRES 모티프를 연결한 후 사이토카인 유전자를 삽입하여 항원과 사이토카인이 동시에 발현될 수 있도록 하였다 (도 15a).

<112> pCK-IL12 벡터에 있는 **서열번호: 22**로 기재되는 염기서열을 갖는 IRES의 *Bam*HI-*Nco*I 위치를 잘라내어 pCK_{TM} 벡터의 *Bam*HI-*Nco*I 위치에 삽입하고 상기 실시예 7에서 준비된 GM-CSF, Flt3L, IL-15, IL-18 및 Eta-1 유전자를 *Nco*I-*Not*I 위치에 삽입하여 벡터를 완성하였다. IL-12와 IL-23 (Belladonna, M. L., et al., *J. Immunol.* 168: 5448-5454, 2002)의 경우는 pCK-IL12에 있는 IRES를 **서열번호: 23**의 IRES-F1 시발체와 **서열번호: 24**의 IRES-R1 시발체를 사용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR) 생성물을 만든 후 pCK_{TM} 벡터의 *Not*I-*Xho*I 위치에 삽입하고 IL-12 또는 IL-23을 *Xho*I-*Xba*I 위치에 삽입하여 완성하였다.

<113> **실시예 10: Her-2/neu와 사이토카인을 동시에 발현하는 플라스미드의 항암효과 평가**

<114> 상기 실시예 9에서 제작된 항원-사이토카인 벡터를 BALB/c 마우스에 3주 간

격으로 2회 100 μg씩 근육주사하여 면역반응을 유도시킨 후 1 $\times 10^{6}$개의 Her2-CT26 암세포를 피하주사하거나 정맥주사하여 Her-2/neu와 사이토카인을 동시에 발현하는 플라스미드의 항암효과를 평가하였다 (도 13a).

<115> 그 결과, 고형암의 성장을 억제하는 예방적 항암효과는 모든 Her-2/neu-사이토카인 벡터에서 우수하였으며, 특히 pCK_{TM}-IL12, pCK_{TM}-Flt3L과 pCK_{TM}-GMCSF의 효과가 두드러졌다 (도 15b). 암전이에 의한 사망 지연 및 억제를 유발하는 예방적 항암효과를 보면, pCK_{TM}-Flt3L이 초기 전이암에 의한 사망 억제효과가 pCK_{TM}만을 투여한 경우 보다 약간 떨어지고 나머지 사이토카인은 그 효과가 pCK_{TM}만을 투여한 경우와 유사하였다 (도 15c 및 15d).

<116> 또한, 2 $\times 10^{5}$개의 Her2-CT26 세포를 먼저 정맥주사하여 암전이를 유발시킨 후 100 μg DNA 백신을 2일 간격으로 3회 투여하여 전이암 치료효과를 분석하였다 (도 14a). 그 결과, pCK 벡터만 투여한 경우에 비해 모든 DNA 백신에서 전이암 치료효과를 보였고, pCK_{TM}보다 나은 전이암에 의한 사망 억제 및 지연효과는 pCK_{TM}-IL18과 pCK_{TM}-GMCSF에서 나타났다 (도 16a 및 16b). 따라서, pCK_{TM}만을 투여한 경우보다는 사이토카인 유전자를 동일한 벡터에 삽입하여 함께 발현되도록 제조한 pCK_{TM}-사이토카인 벡터가 항암효과가 높은 경우가 있고, 특히 pCK_{TM}-GMCSF와 pCK_{TM}-IL18에서 뛰어난 항암효과를 보였다. 이로부터 인간 Her-2/neu 유전자와 사이토

카인 유전자를 병용투여하는 것이 실제 임상에 사용할 때 더 큰 효과를 발휘할 수 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<117> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 Her-2/neu DNA 백신은 암 수술 후 전이를 감소시키는 치료용 백신 및 유전적으로 암 발병 위험이 있는 사람을 위한 예방용 백신으로서 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

세포 내 영역이 제거된 **서열번호: 2**의 인간 Her-2/neu 유전자를 플라스미드 pTV2 또는 pCK에 삽입하여 제조된, 항암효과를 갖는 플라스미드.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

인간 Her-2/neu 유전자에서 막관통 영역이 추가로 제거된 **서열번호: 3**의 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 3】

제 2항에 있어서,

인간 Her-2/neu 유전자의 신호 펩타이드가 허피스 심플렉스 타입 I 당단백질 D (gD)의 신호 펩타이드 서열로 추가로 치환된 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 4】

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

플라스미드 $pNeu_{TM}$ (KCCM-10393), $pNeu_{ECD}$ (KCCM-10394), pCK_{TM} (KCCM-10396), pCK_{ECD} (KCCM-10395), $pNeu_{TM}$-gDs 및 $pNeu_{ECD}$-gDs로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 5】

제 1항에 있어서,

인간 Her-2/neu 유전자와 사이토카인 유전자가 동시에 발현되는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 6】

제 5항에 있어서,

사이토카인 유전자가 과립구-대식세포 콜로니 자극인자 (Granulocyte-Marcrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSF), FMS-유사 티로신 키나아제 3 리간드 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; Flt3L), 초기 T 림파구 활성인자-1 (Early T lymphocyte activation-1; Eta-1), 인터루킨-12 (Interleukin-12; IL-12), 인터루킨-15 (IL-15) 및 인터루킨-18 (IL-18)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 7】

제 1항의 플라스미드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 조성물.

【청구항 8】

제 7항에 있어서,

사이토카인 유전자를 발현하는 플라스미드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

제 8항에 있어서,

사이토카인 유전자가 GM-CSF, Flt3L, Eta-1, IL-12, IL-15 및 IL-18로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제 1항의 플라스미드를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 백신.

【청구항 11】

제 10항에 있어서,

사이토카인 유전자를 발현하는 플라스미드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

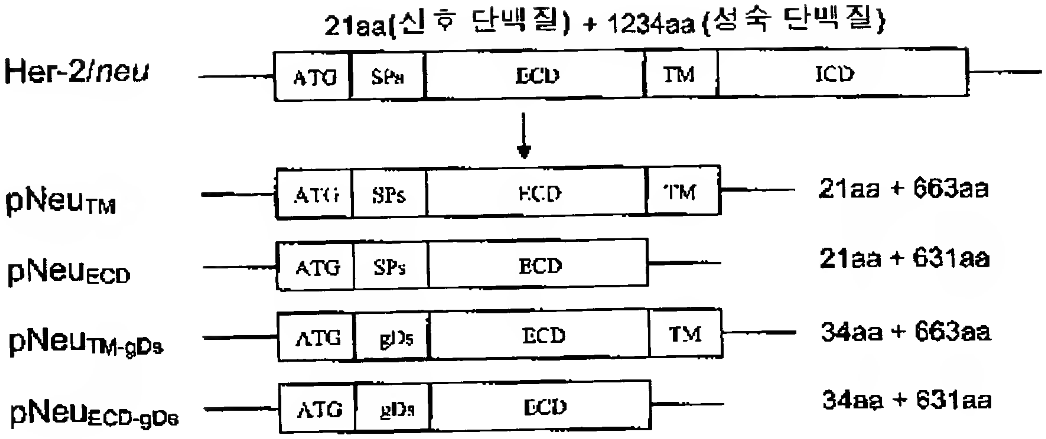
【청구항 12】

제 11항에 있어서,

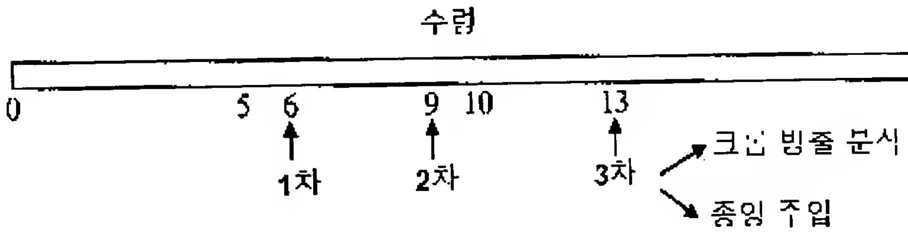
사이토카인 유전자가 GM-CSF, Flt3L, Eta-1, IL-12, IL-15 및 IL-18로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

【도면】

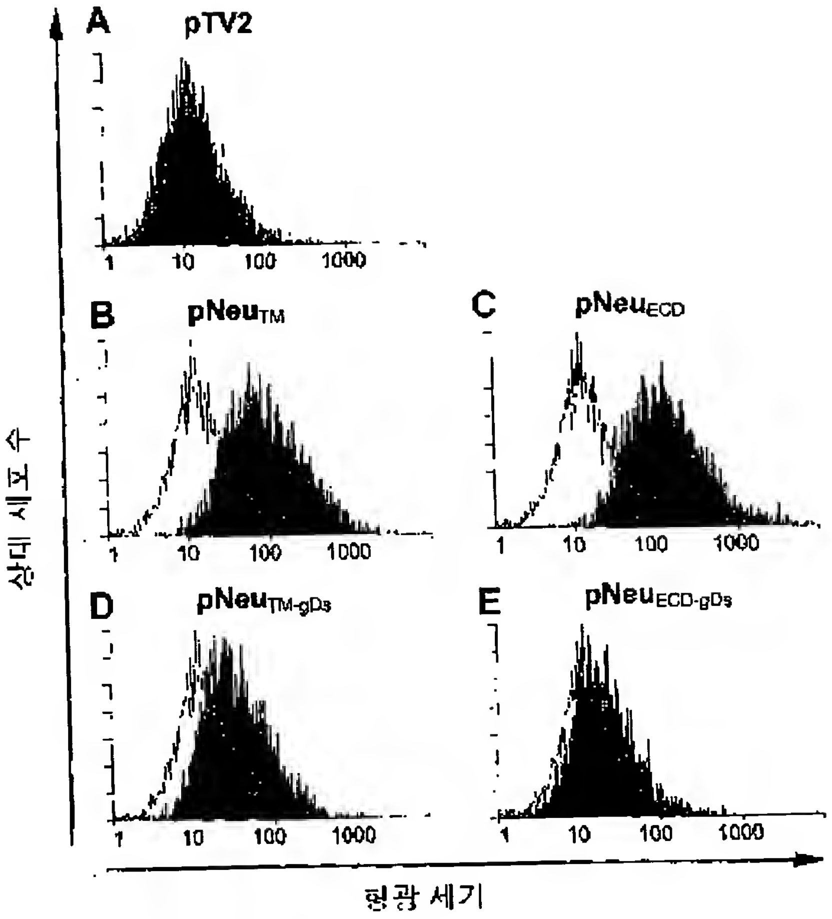
【도 1a】


21aa(신호 단백질) + 1234aa(성숙 단백질)
Her-2/neu
ATG
SPs
ECD
TM
ICD
pNeuTM
21aa + 663aa
pNeuECD
21aa + 631aa
pNeuTM-gDs
gDs
34aa + 663aa
pNeuECD-gDs
34aa + 631aa

【도 1b】

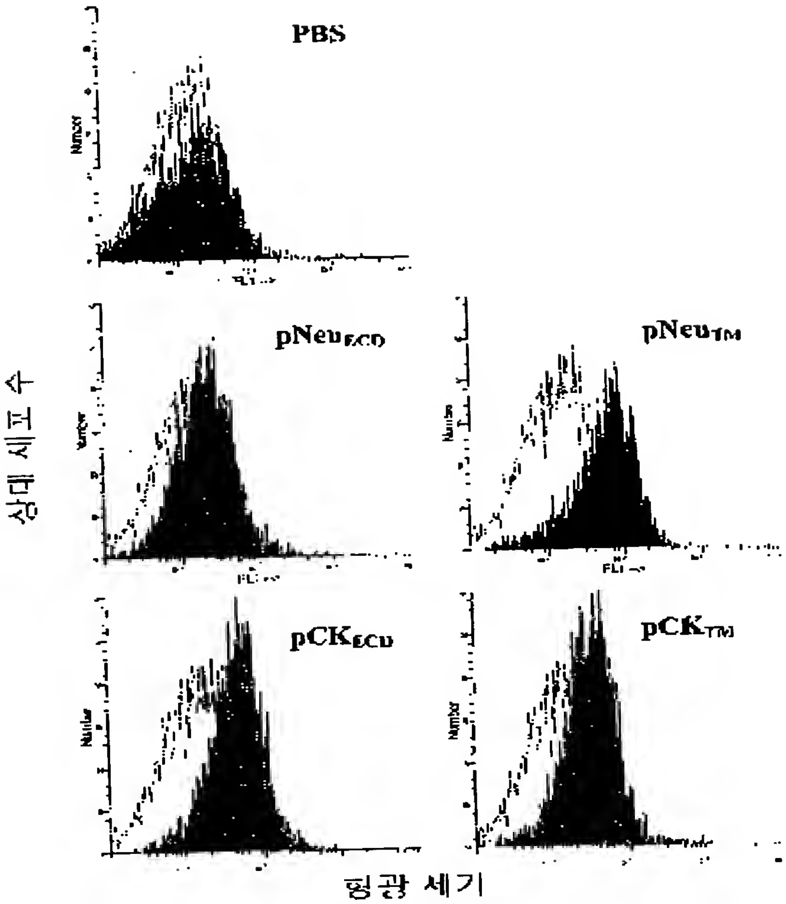

수령
0
5
6
9
10
13
1차
2차
3차
크로 빙출 분석
종양 주입

【도 2】



BEST AVAILABLE COPY

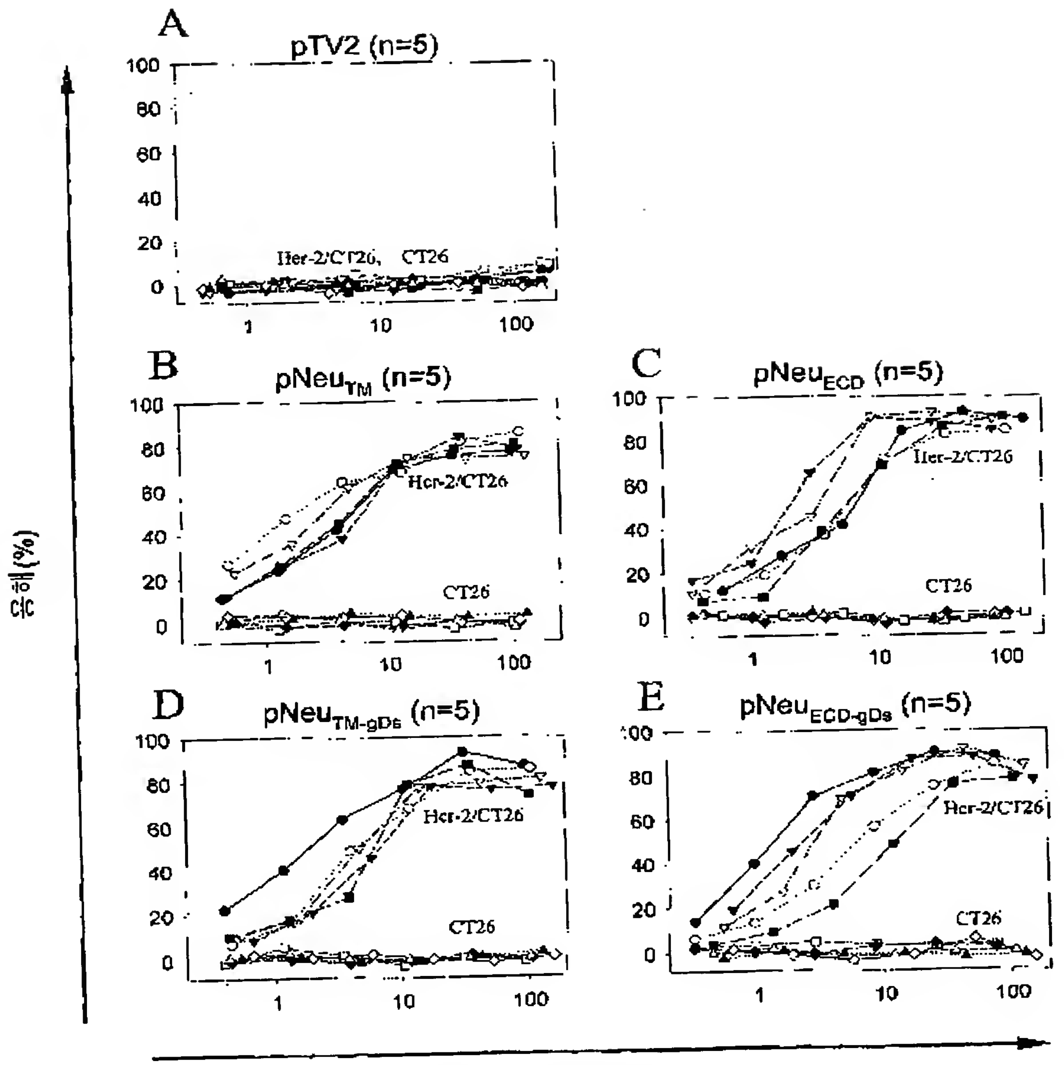
【도 3】



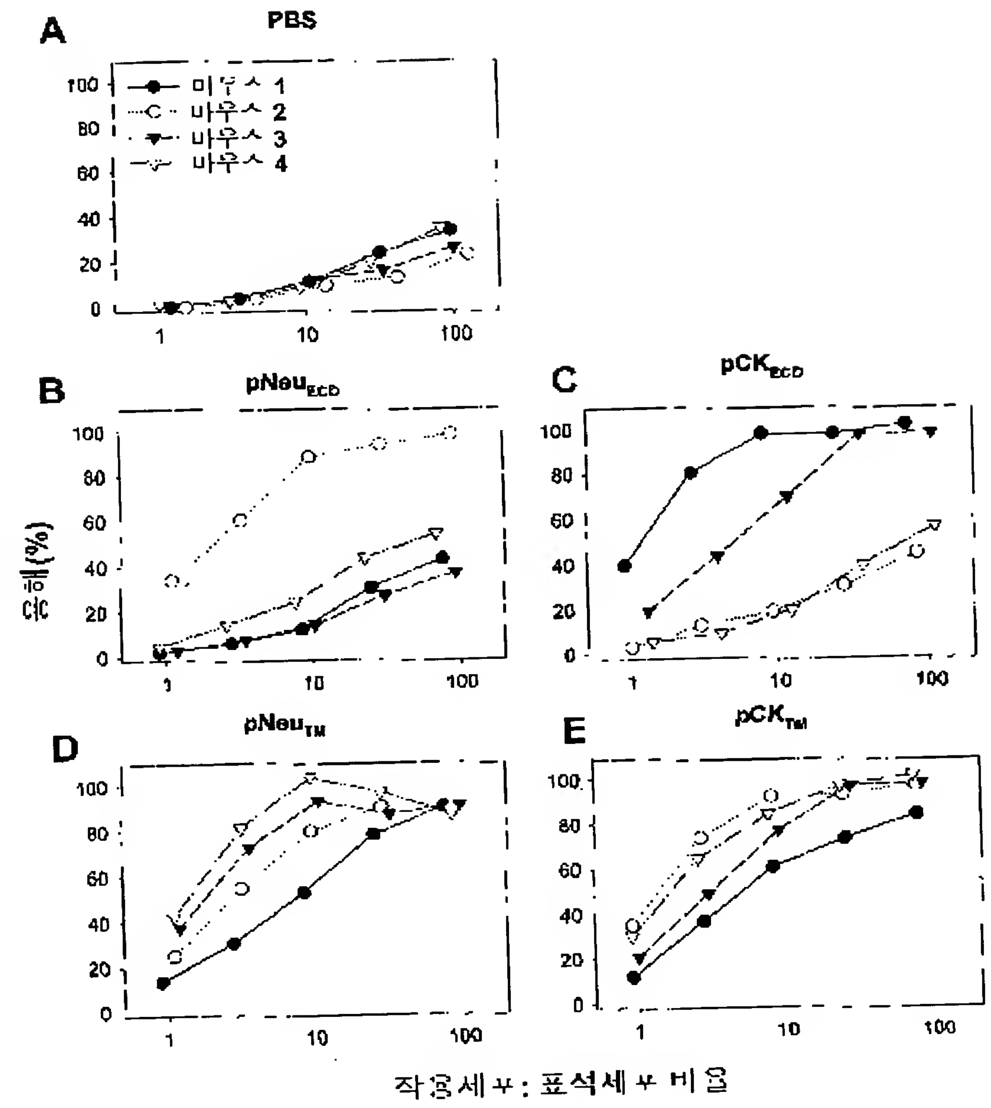
【도 4】

BEST AVAILABLE COPY

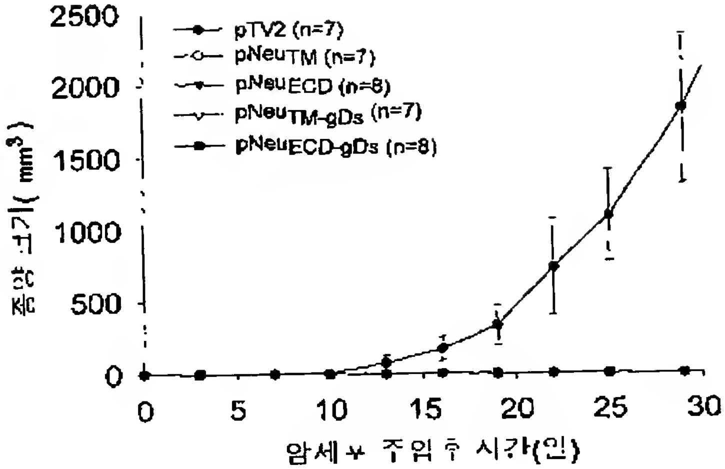
【도 5】


A
pTV2 (n=5)
Her-2/CT26, CT26
B
pNeu$_{TM}$ (n=5)
Her-2/CT26
CT26
C
pNeu$_{ECD}$ (n=5)
Her-2/CT26
CT26
D
pNeu$_{TM-gDs}$ (n=5)
Her-2/CT26
CT26
E
pNeu$_{ECD-gDs}$ (n=5)
Her-2/CT26
CT26
용해(%)
작용세포 : 표적세포 비율

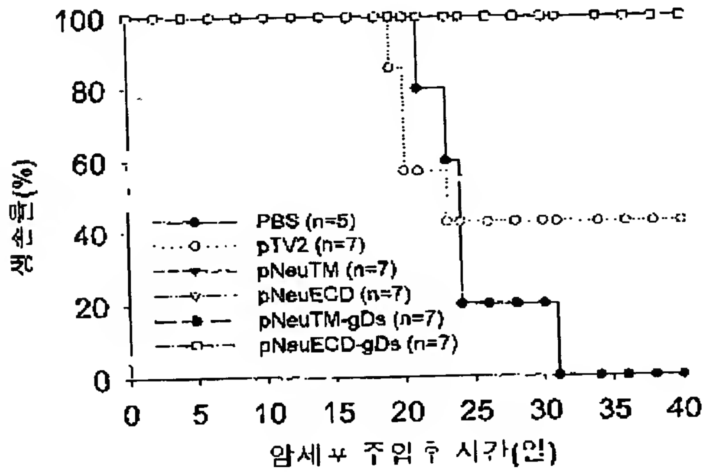
【도 6】


A
PBS
마우스 1
마우스 2
마우스 3
마우스 4
B
pNeu$_{ECD}$
C
pCK$_{ECD}$
D
pNeu$_{TM}$
E
pCK$_{TM}$
용해(%)
0
20
40
60
80
100
1
10
100
작용세포 : 표적세포 비율

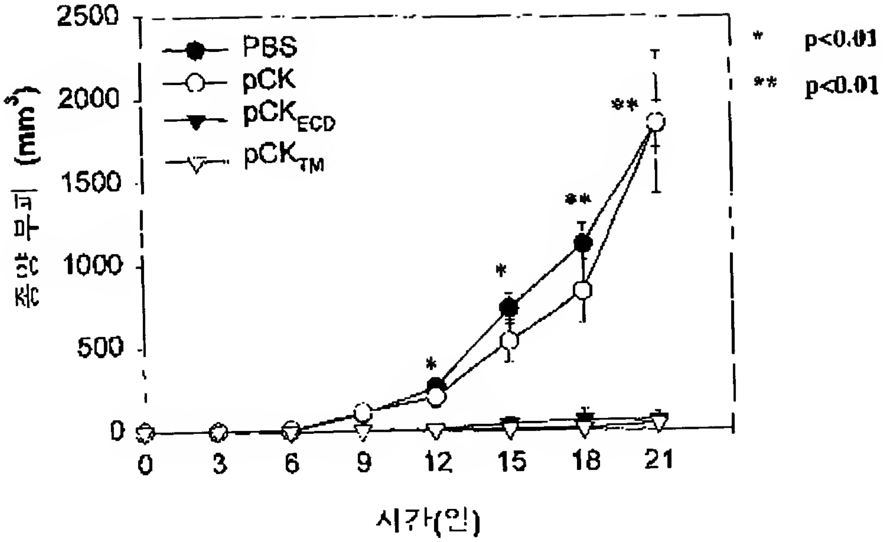
【도 7a】


2500
2000
1500
1000
500
0
pTV2 (n=7)
pNeuTM (n=7)
pNeuECD (n=8)
pNeuTM-gDs (n=7)
pNeuECD-gDs (n=8)
0
5
10
15
20
25
30

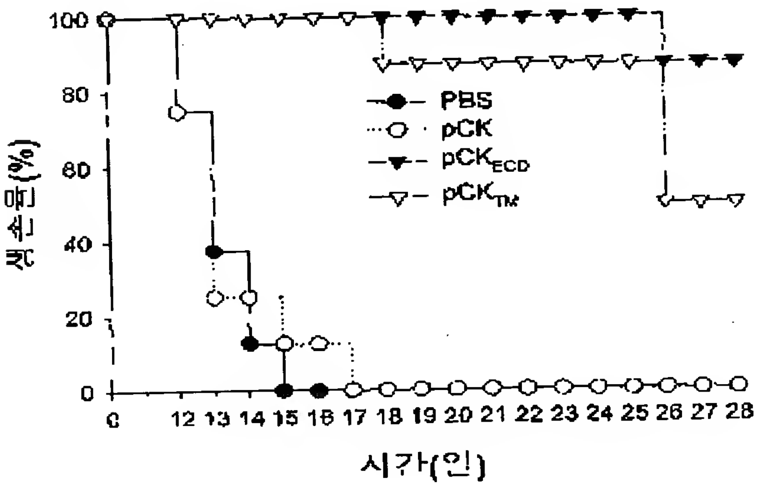
【도 7b】


100
80
60
40
20
0
PBS (n=5)
pTV2 (n=7)
pNeuTM (n=7)
pNeuECD (n=7)
pNeuTM-gDs (n=7)
pNeuECD-gDs (n=7)
0
5
10
15
20
25
30
35
40

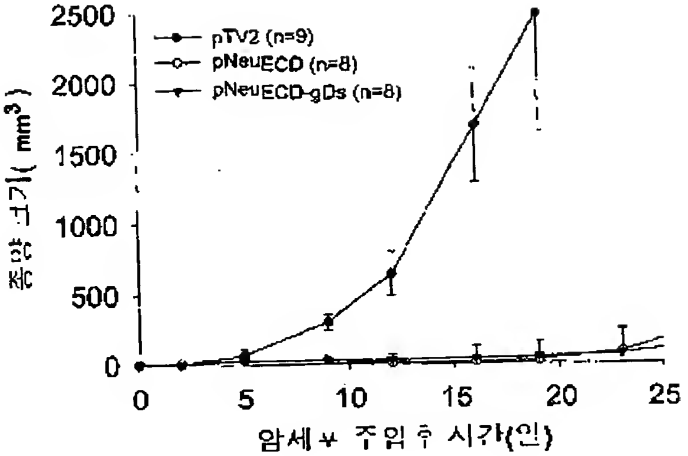
【도 8a】


2500
2000
1500
1000
500
0
종양 부피 (mm³)
PBS
pCK
pCK_ECD
pCK_TM
* p<0.01
** p<0.01
0 3 6 9 12 15 18 21
시간(일)

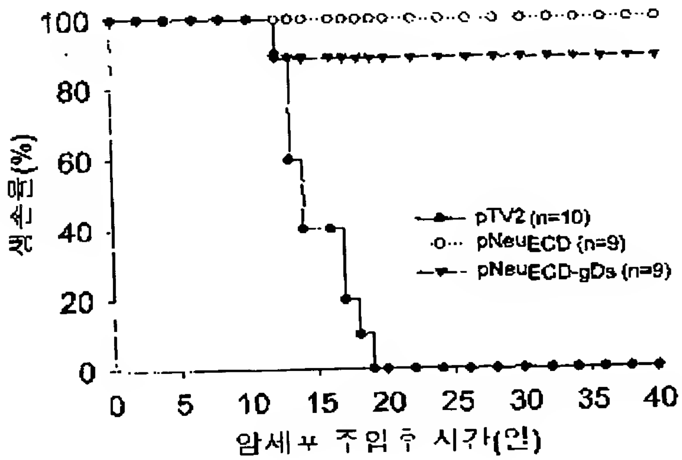
【도 8b】


100
80
60
40
20
0
생존율(%)
PBS
pCK
pCK_ECD
pCK_TM
0 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
시간(일)

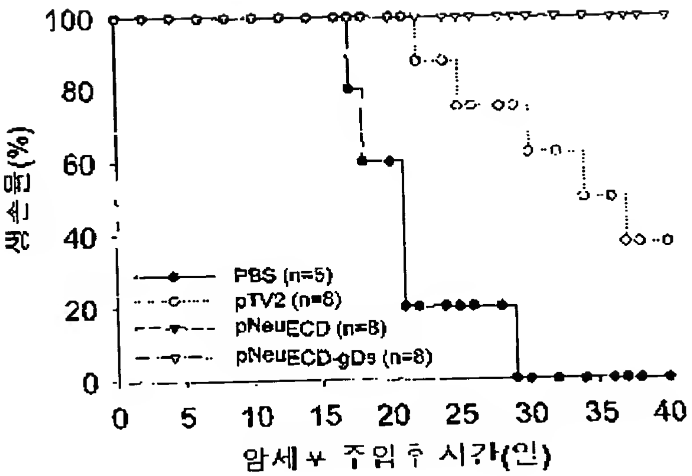
【도 9a】


2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 10 15 20 25
pTV2 (n=9)
pNeuECD (n=8)
pNeuECD-gDs (n=8)
종양 크기(mm3)
암세포 주입후 시간(일)

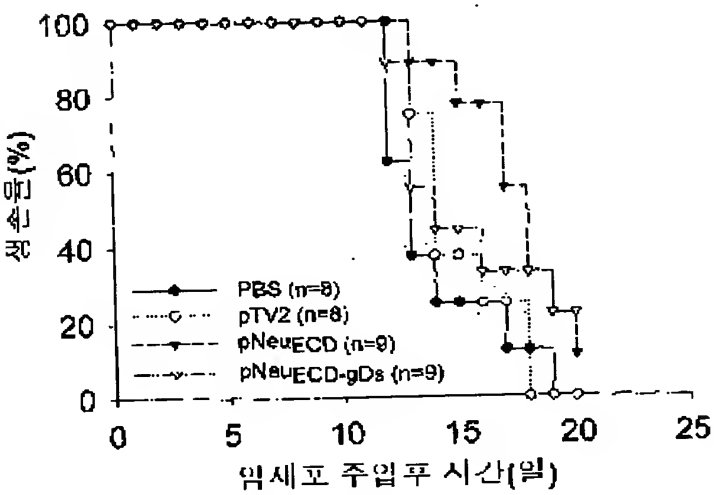
【도 9b】


100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
pTV2 (n=10)
pNeuECD (n=9)
pNeuECD-gDs (n=9)
생존률(%)
암세포 주입후 시간(일)

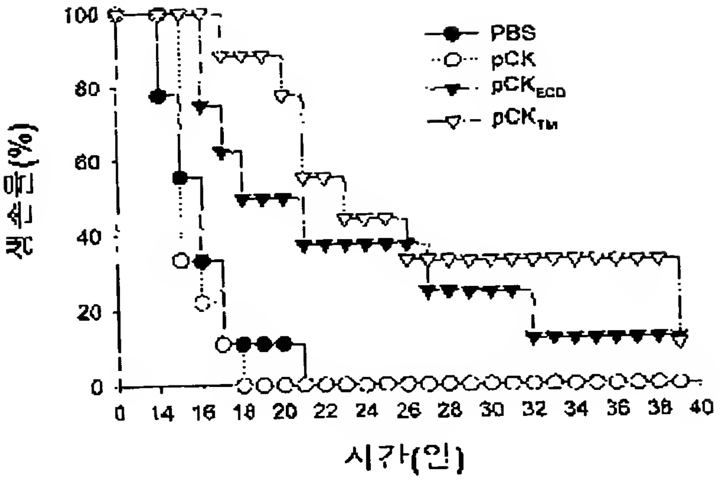
【도 10a】


100
80
60
40
20
0
PBS (n=5)
pTV2 (n=8)
pNeuECD (n=8)
pNeuECD-gDs (n=8)
0 5 10 15 20 25 30 35 40

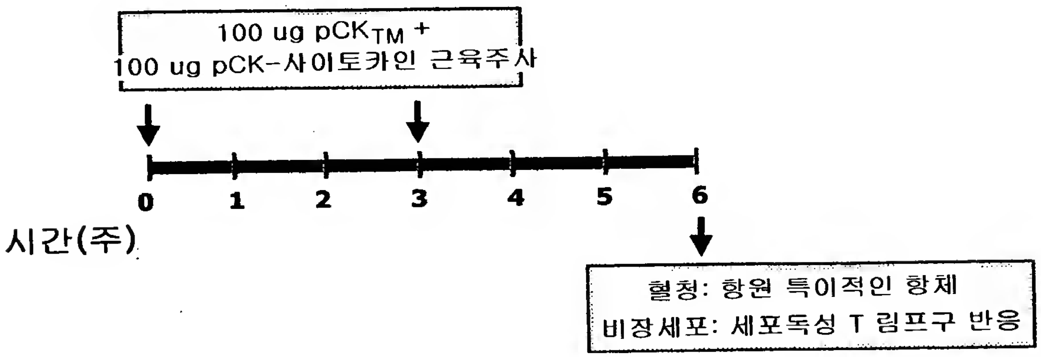
【도 10b】


생존율(%)
100
80
60
40
20
0
PBS (n=8)
pTV2 (n=8)
pNeuECD (n=9)
pNeuECD-gDs (n=9)
0 5 10 15 20 25
암세포 주입후 시간(일)

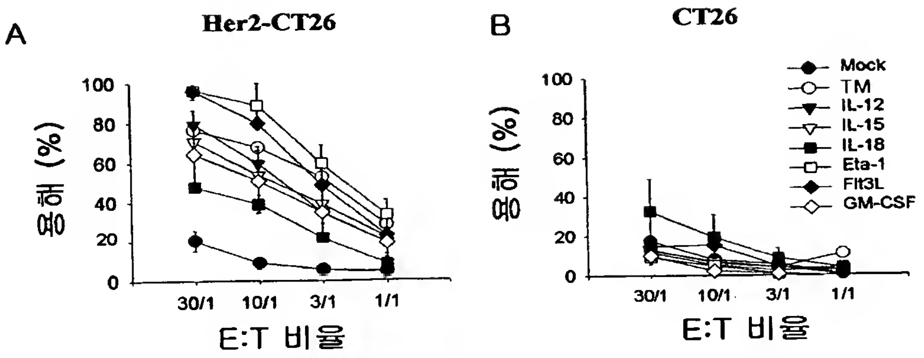
【도 11】


PBS
pCK
pCK_ECD
pCK_TM
100
80
60
40
20
0
0 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40
시간(일)

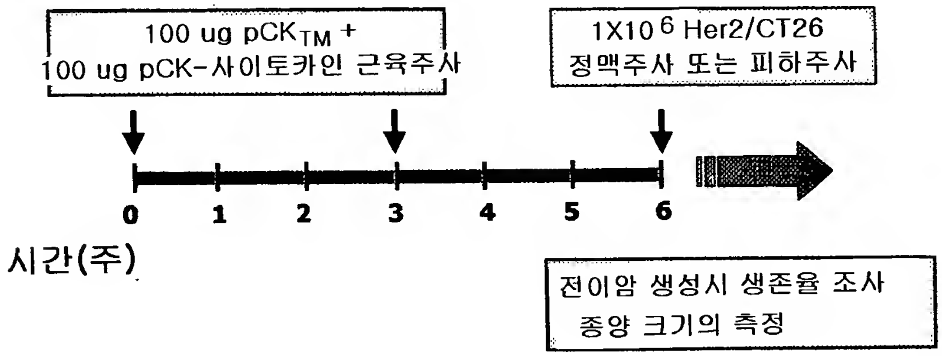
【도 12a】


100 ug pCK_TM +
100 ug pCK-사이토카인 근육주사
0 1 2 3 4 5 6
시간(주)
혈청: 항원 특이적인 항체
비장세포: 세포독성 T 림프구 반응

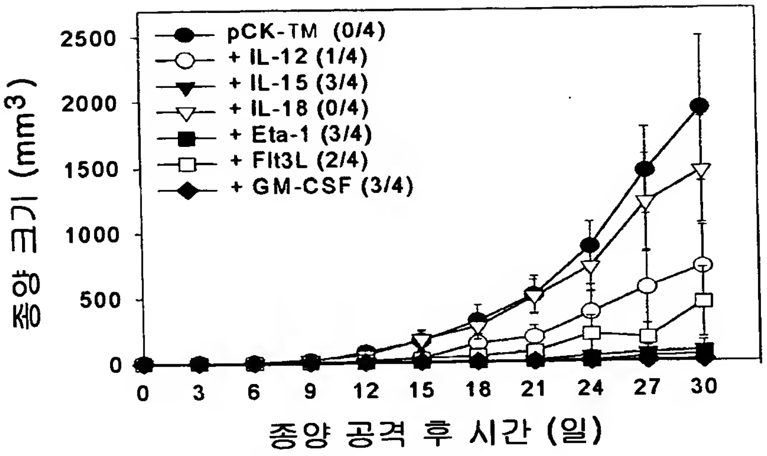
【도 12b】


A
Her2-CT26
용해 (%)
100
80
60
40
20
0
30/1
10/1
3/1
1/1
E:T 비율
B
CT26
용해 (%)
Mock
TM
IL-12
IL-15
IL-18
Eta-1
Flt3L
GM-CSF
E:T 비율

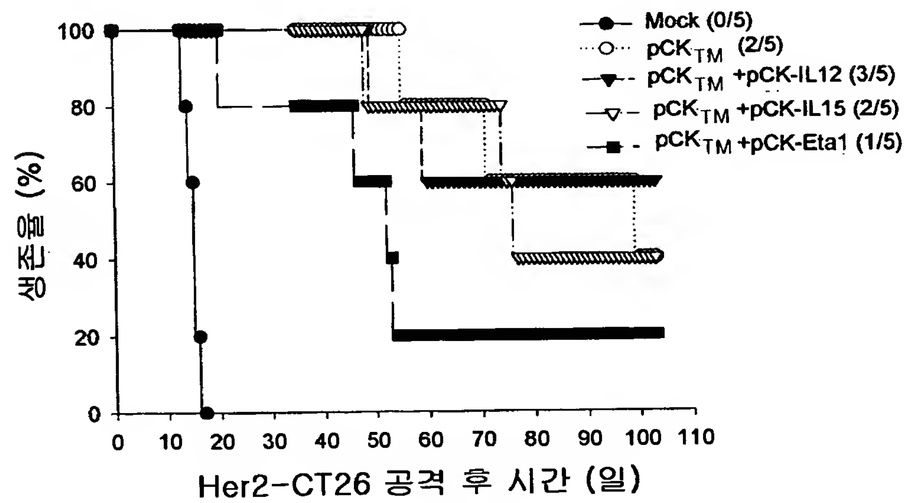
【도 13a】


100 ug pCK$_{TM}$ +
100 ug pCK-사이토카인 근육주사
1X10 6 Her2/CT26
정맥주사 또는 피하주사
0
1
2
3
4
5
6
시간(주)
전이암 생성시 생존율 조사
종양 크기의 측정

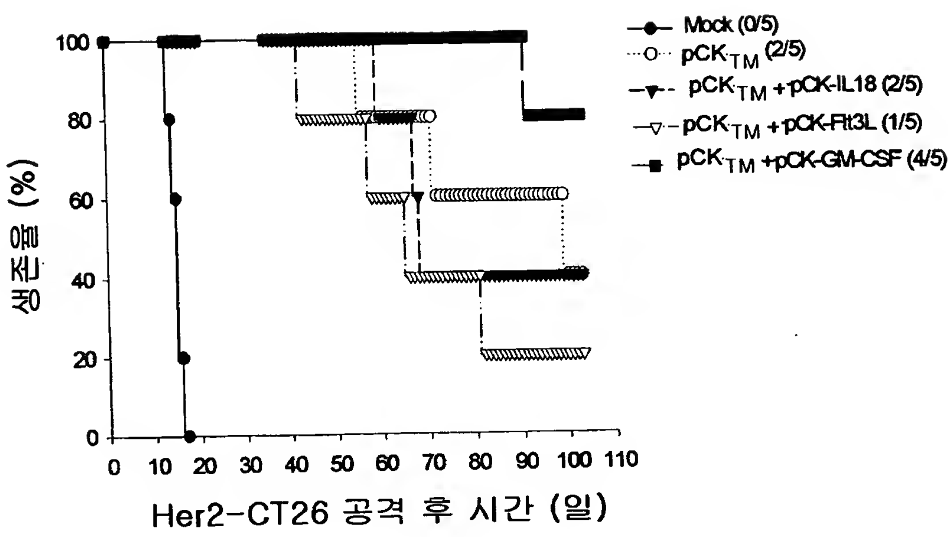
【도 13b】


pCK-TM (0/4)
+ IL-12 (1/4)
+ IL-15 (3/4)
+ IL-18 (0/4)
+ Eta-1 (3/4)
+ Flt3L (2/4)
+ GM-CSF (3/4)
종양 크기 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
종양 공격 후 시간 (일)

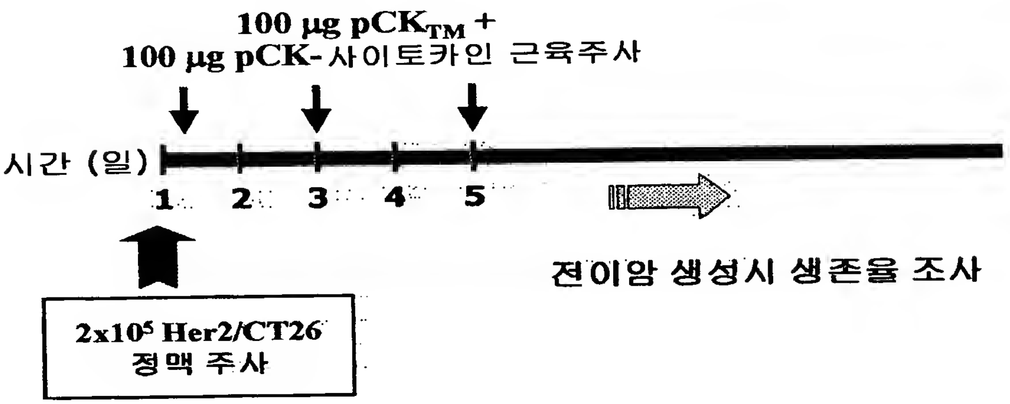
【도 13c】


Mock (0/5)
pCKTM (2/5)
pCKTM +pCK-IL12 (3/5)
pCKTM +pCK-IL15 (2/5)
pCKTM +pCK-Eta1 (1/5)
생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Her2-CT26 공격 후 시간 (일)

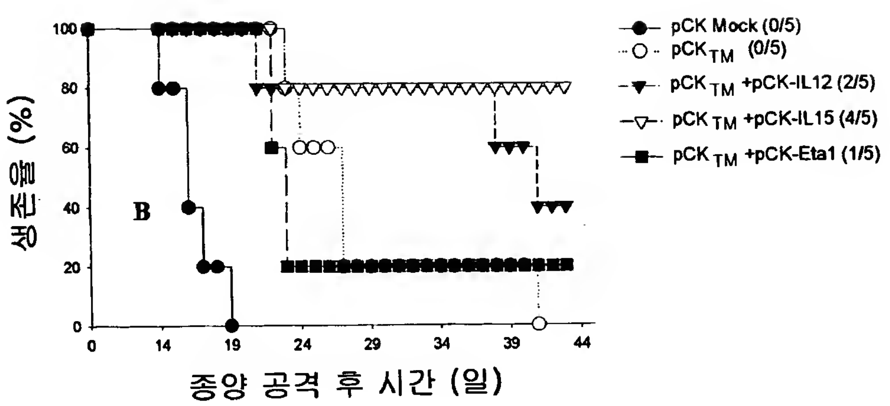
【도 13d】


Mock (0/5)
pCK TM (2/5)
pCK TM +pCK-IL18 (2/5)
pCK TM +pCK-Flt3L (1/5)
pCK TM +pCK-GM-CSF (4/5)
100
80
60
40
20
0
생존율 (%)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Her2-CT26 공격 후 시간 (일)

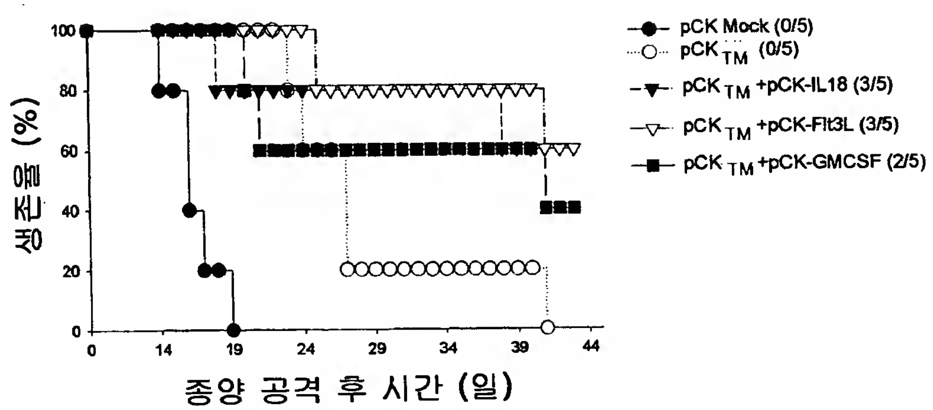
【도 14a】


100 μg pCKTM +
100 μg pCK-사이토카인 근육주사
시간 (일)
1 2 3 4 5
전이암 생성시 생존율 조사
2x10⁵ Her2/CT26
정맥 주사

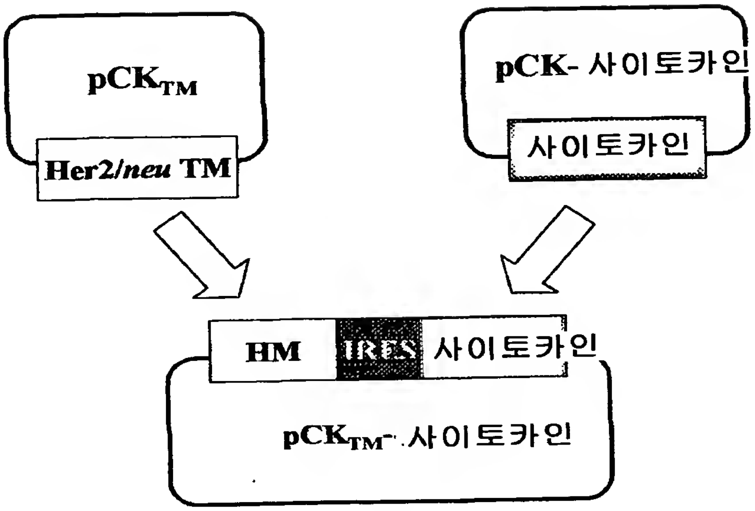
【도 14b】


pCK Mock (0/5)
pCK TM (0/5)
pCK TM +pCK-IL12 (2/5)
pCK TM +pCK-IL15 (4/5)
pCK TM +pCK-Eta1 (1/5)
생존율 (%)
B
100
80
60
40
20
0
0
14
19
24
29
34
39
44
종양 공격 후 시간 (일)

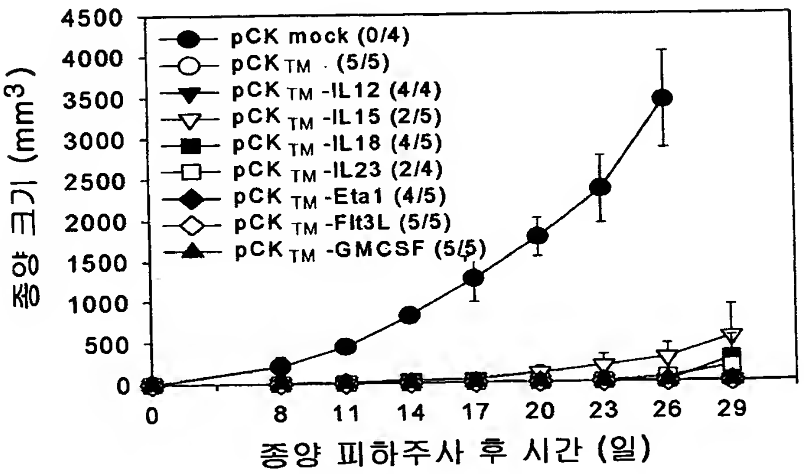
【도 14c】


pCK Mock (0/5)
pCK TM (0/5)
pCK TM +pCK-IL18 (3/5)
pCK TM +pCK-Flt3L (3/5)
pCK TM +pCK-GMCSF (2/5)
생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
0
14
19
24
29
34
39
44
종양 공격 후 시간 (일)

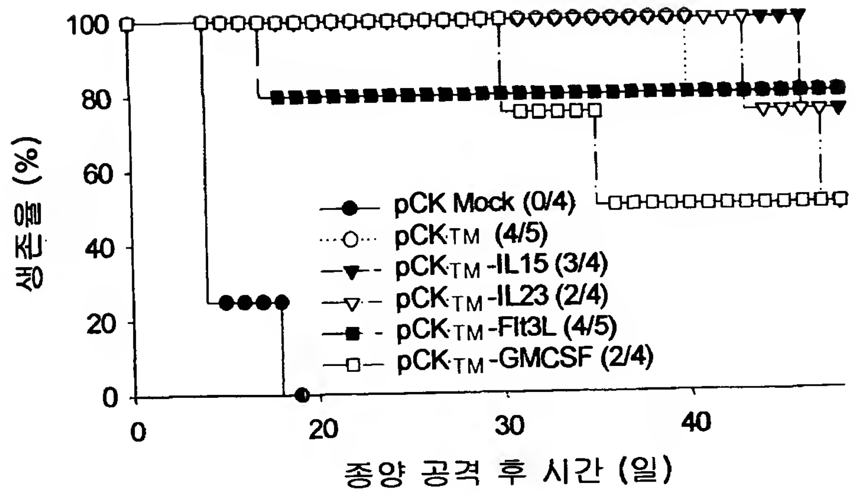
【도 15a】


pCKTM
Her2/neu TM
pCK- 사이토카인
사이토카인
HM
IRES
사이토카인
pCKTM- 사이토카인

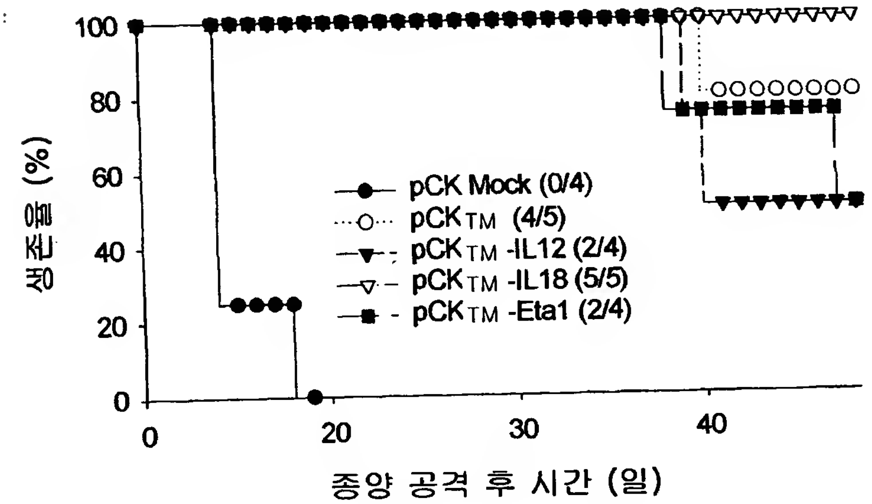
【도 15b】


4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
종양 크기 (mm3)
pCK mock (0/4)
pCK TM (5/5)
pCK TM -IL12 (4/4)
pCK TM -IL15 (2/5)
pCK TM -IL18 (4/5)
pCK TM -IL23 (2/4)
pCK TM -Eta1 (4/5)
pCK TM -Flt3L (5/5)
pCK TM -GMCSF (5/5)
0
8
11
14
17
20
23
26
29
종양 피하주사 후 시간 (일)

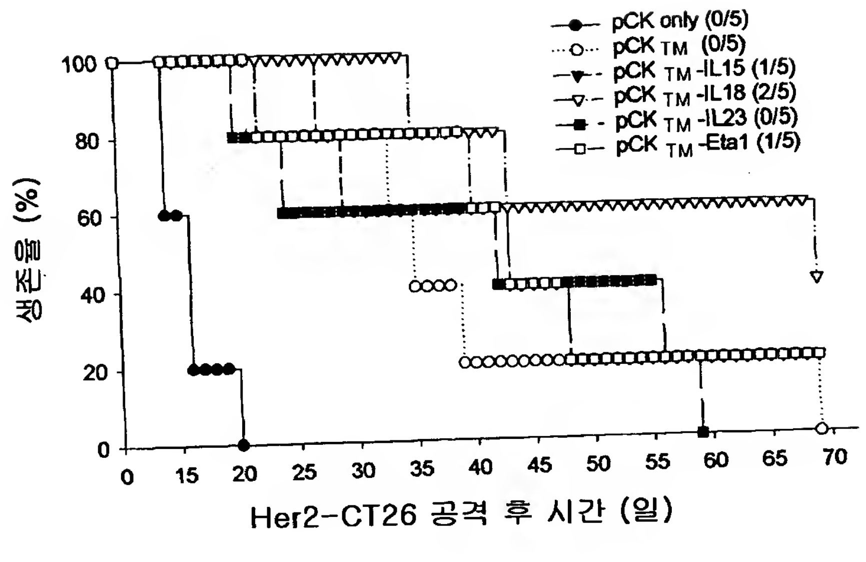
【도 15c】


100
80
60
40
20
0
생존율 (%)
0
20
30
40
종양 공격 후 시간 (일)
pCK Mock (0/4)
pCKTM (4/5)
pCKTM -IL15 (3/4)
pCKTM -IL23 (2/4)
pCKTM -Flt3L (4/5)
pCKTM -GMCSF (2/4)

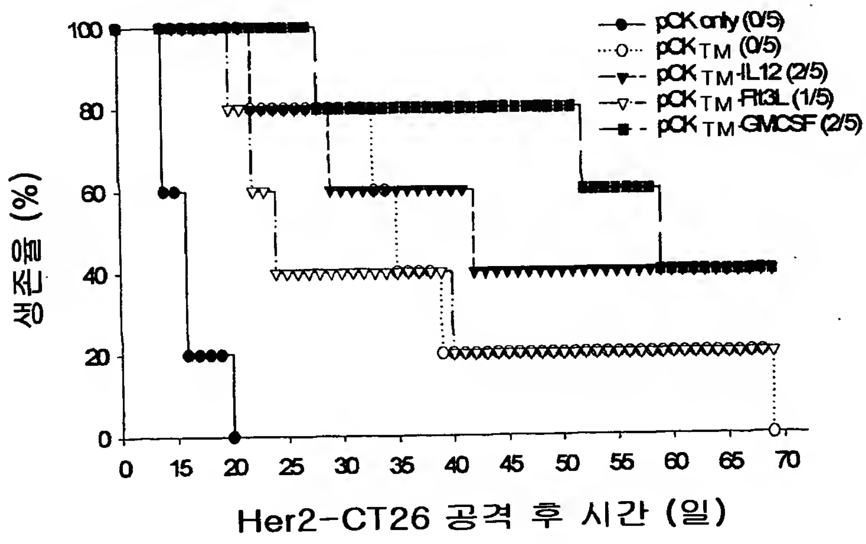
【도 15d】


100
80
60
40
20
0
생존율 (%)
0
20
30
40
종양 공격 후 시간 (일)
pCK Mock (0/4)
pCKTM (4/5)
pCKTM -IL12 (2/4)
pCKTM -IL18 (5/5)
pCKTM -Eta1 (2/4)

【도 16a】



【도 16b】



【서열목록】

<110> PANGENOMICS Co., Ltd

<120> Her-2/neu DNA VACCINE HAVING ANTI-CANCER ACTIVITY

<130> FPD/200305-0145

<150> KR2002-41764

<151> 2002-07-16

<160> 24

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 4530

<212> DNA

<213> human Her-2/neu gene cDNA

<400> 1

```
aattctcgag ctcgtcgacc ggtcgacgag ctcgagggtc gacgagctcg agggcgcgcg      60
cccggccccc acccctcgca gcaccccgcg ccccgcgccc tcccagccgg gtccagccgg     120
agccatgggg ccggagccgc agtgagcacc atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg     180
ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac     240
atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag acccacctgg acatgctccg ccacctctac     300
cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg gaactcacct acctgcccac caatgccagc     360
ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa     420
gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac     480
aactatgccc tggccgtgct agacaatgga gacccgctga acaataccac ccctgtcaca     540
ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa     600
ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag     660
gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg     720
gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag ggctcccgct gctggggaga gagttctgag     780
gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca     840
ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt gctgccggct gcacgggccc caagcactct     900
gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc     960
ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag tccatgccca atcccgaggg ccggtataca    1020
ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc    1080
tgcaccctcg tctgccccct gcacaaccaa gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg    1140
tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg    1200
cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat atccaggagt ttgctggctg caagaagatc    1260
tttgggagcc tggcatttct gccggagagc tttgatgggg acccagcctc caacactgcc    1320
ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt gagactctgg aagagatcac aggttaccta    1380
tacatctcag catggccgga cagcctgcct gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta    1440
atccggggac gaattctgca caatggcgcc tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc    1500
agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa ctgggcagtg gactggccct catccaccat    1560
aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac    1620
caagctctgc tccacactgc caaccggcca gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc    1680
```

tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac 1740

tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc 1800

cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag 1860

aatggctcag tgacctgttt tggaccggag gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat 1920

aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac 1980

atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc 2040

acccactcct gtgtggacct ggatgacaag ggctgccccg ccgagcagag agccagccct 2100

ctgacgtcca tcgtctctgc ggtggttggc attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc 2160

tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag aagatccgga agtacacgat gcggagactg 2220

ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg 2280

cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct 2340

tttggcacag tctacaaggg catctggatc cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg 2400

gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa 2460

gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca tatgtctccc gccttctggg catctgcctg 2520

acatccacgg tgcagctggt gacacagctt atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc 2580

cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag gacctgctga actggtgtat gcagattgcc 2640

aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac 2700

gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa attacagact tcgggctggc tcggctgctg 2760

gacattgacg agacagagta ccatgcagat gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg 2820

ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg 2880

actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc aaaccttacg atgggatccc agcccgggag 2940

atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg ctgccccagc ccccccatctg caccattgat 3000

gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg attgactctg aatgtcggcc aagattccgg 3060

gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag 3120

aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg gacagcacct tctaccgctc actgctggag 3180

gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct gaggagtatc tggtacccca gcagggcttc 3240

ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca 3300

tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca ctagggctgg agccctctga agaggaggcc 3360

cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg gctggctccg atgtatttga tggtgacctg 3420

ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc ctccccacac atgaccccag ccctctacag 3480

cggtacagtg aggaccccac agtacccctg ccctctgaga ctgatggcta cgttgccccc 3540

ctgacctgca gcccccagcc tgaatatgtg aaccagccag atgttcggcc ccagcccccct 3600

tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc cgacctgctg gtgccactct ggaaagggcc 3660

aagactctct ccccagggaa gaatggggtc gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc 3720

gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct 3780

cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc tattactggg accaggaccc accagagcgg 3840

ggggctccac ccagcacctt caaagggaca cctacggcag agaacccaga gtacctgggt 3900

ctggacgtgc cagtgtgaac cagaaggcca agtccgcaga agccctgatg tgtcctcagg 3960
gagcagggaa ggcctgactt ctgctggcat caagaggtgg gagggccctc cgaccacttc 4020
caggggaacc tgccatgcca ggaacctgtc ctaaggaacc ttccttcctg cttgagttcc 4080
cagatggctg gaaggggtcc agcctcgttg gaagaggaac agcactgggg agtctttgtg 4140
gattctgagg ccctgcccaa tgagactcta gggtccagtg gatgccacag cccagcttgg 4200
ccctttcctt ccagatcctg ggtactgaaa gccttaggga agctggcctg agaggggaag 4260
cggccctaag ggagtgtcta agaacaaaag cgacccattc agagactgtc cctgaaacct 4320
agtactgccc cccatgagga aggaacagca atggtgtcag tatccaggct ttgtacagag 4380
tgcttttctg tttagttttt actttttttg ttttgttttt ttaaagacga aataaagacc 4440
caggggagaa tgggtgttgt atggggaggc aagtgtgggg ggtccttctc cacacccact 4500
ttgtccattt gcaaatatat tttggaaaac 4530

<210> 2

<211> 2052

<212> DNA

<213> human Her-2/neu gene without intracellular region

<400> 2

atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60
gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120
acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180
gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240
cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300
attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360
gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480
ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540
ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600
ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660
gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720
gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780
agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840
tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900
tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgccccct gcacaaccaa 960
gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020
gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080
atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140
tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260

gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320

tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380

ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440

ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500

gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560

tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620

gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680

ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740

gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800

cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860

ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920

ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcgtctctgc ggtggttggc 1980

attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040

aagatccgga ag 2052

<210> 3

<211> 1956

<212> DNA

<213> human Her-2/neu gene without intracellular region and transmembrane domain

<400> 3

atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60

gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120

acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180

gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240

cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300

attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360

gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420

cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480

ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540

ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600

ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660

gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720

gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780

agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840

tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900

tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgccccct gcacaaccaa 960

gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020

gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080

atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140
tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260
gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320
tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380
ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440
ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500
gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560
tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620
gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680
ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800
cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860
ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacg 1956

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NF6 primer

<400> 4

ggtaccatgg agctggcggc cttgtgc 27

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NSR1 primer

<400> 5

gtctagatga ttcacgtcag agggctggct c 31

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NF5 primer

<400> 6

gcagtggtac ccaagcttag cac 23

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NRM2 primer

<400> 7

ttctagagca gtctccgcat cgtctac 27

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NSF2 primer

<400> 8

ggcgcgcccc ggcacagaca tgaagctg 28

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NF3 primer

<400> 9

gccgcagcgg ccgccatgga gctg 24

<210> 10

<211> 1535

<212> DNA

<213> mouse Eta-1 gene

<400> 10

gggggggggg gggggggggg ggggctttcc ttgctcctta tgagaggtgg agaggtagaa 60

aaggcacaca aatattgact cactgaaatt ttctctgaga tgtagaaaga ttccataaat 120

tattggtgac ttggtggtga tctagtggtg ccaagagtgt gtttgaacct gacaagacat 180

caactgtgcc tcataaaata tgttgcagga ctaactacga ccatgagatt ggcagtgatt 240

tgcttttgcc tgtttggcat tgcctcctcc ctcccggtga aagtgactga ttctggcagc 300

tcagaggaga agctttacag cctgcaccca gatcctatag ccacatggcc ggtgcctgac 360

ccatctcaga agcagaatct ccttgcgcca cagaatgctg tgtcctctga agaaaaggat 420

gactttaagc aagaaactct tccaagcaat tccaatgaaa gccatgacca catggacgac 480
gatgatgacg atgatgatga cgatggagac catgcagaga gcgaggattc tgtggactcg 540
gatgaatctg acgaatctca ccattcggat gagtctgatg agaccgtcac tgctagtaca 600
caagcagaca ctttcactcc aatcgtccct acagtcgatg tccccaacgg ccgaggtgat 660
agcttggctt atggactgag gtcaaagtct aggagtttcc aggtttctga tgaacagtat 720
cctgatgcca cagatgagga cctcacctct cacatgaaga gcggtgagtc taaggagtcc 780
ctcgatgtca tccctgttgc ccagcttctg agcatgccct ctgatcagga caacaacgga 840
aagggcagcc atgagtcaag tcagctggat gaaccaagtc tggaaacaca cagacttgag 900
cattccaaag agagccagga gagtgccgat cagtcggatg tgatcgatag tcaagcaagt 960
tccaaagcca gcctggaaca tcagagccac aagtttcaca gccacaagga caagctagtc 1020
ctagacccta agagtaagga agatgatagg tatctgaaat tccgaatttc tcatgaatta 1080
gagagttcat cttctgaggt caactaaaga agaggcaaaa acacagttcc ttactttgca 1140
tttagtaaaa acaagaaaaa gtgttagtga gggttaagca ggaatactaa ctgctcattt 1200
ctcagttcag tggatatatg tatgtagaga aagagaggta atattttggg ctcttagctt 1260
agtctgttgt ttcatgcaaa caccgttgta accaaaagct tctgcacttt gcttctgttg 1320
ttcctgtaca agaaatgcaa cggccactgc attttaatga ttgttattct ttcatgaata 1380
aaatgtatgt agaaataagt aaatttactg aaacaagcaa gaattaaaag agaaactgta 1440
acagtctata tcactatacc ctttagttt tataattagc atatattttg ttgtgattta 1500
ttttttttg ttggtgtgaa taaatcttgt taacg 1535

<210> 11

<211> 1535

<212> DNA

<213> mouse IL-18 gene

<400> 11

gggggggggg gggggggggg ggggctttcc ttgctcctta tgagaggtgg agaggtagaa 60
aaggcacaca aatattgact cactgaaatt ttctctgaga tgtagaaaga ttccataaat 120
tattggtgac ttggtggtga tctagtggtg ccaagagtgt gtttgaacct gacaagacat 180
caactgtgcc tcataaaata tgttgcagga ctaactacga ccatgagatt ggcagtgatt 240
tgcttttgcc tgtttggcat tgcctcctcc ctcccggtga aagtgactga ttctggcagc 300
tcagaggaga agctttacag cctgcaccca gatcctatag ccacatggcc ggtgcctgac 360
ccatctcaga agcagaatct ccttgcgcca cagaatgctg tgtcctctga agaaaaggat 420
gactttaagc aagaaactct tccaagcaat tccaatgaaa gccatgacca catggacgac 480
gatgatgacg atgatgatga cgatggagac catgcagaga gcgaggattc tgtggactcg 540
gatgaatctg acgaatctca ccattcggat gagtctgatg agaccgtcac tgctagtaca 600
caagcagaca ctttcactcc aatcgtccct acagtcgatg tccccaacgg ccgaggtgat 660
agcttggctt atggactgag gtcaaagtct aggagtttcc aggtttctga tgaacagtat 720
cctgatgcca cagatgagga cctcacctct cacatgaaga gcggtgagtc taaggagtcc 780

ctcgatgtca tccctgttgc ccagcttctg agcatgccct ctgatcagga caacaacgga 840
aagggcagcc atgagtcaag tcagctggat gaaccaagtc tggaaacaca cagacttgag 900
cattccaaag agagccagga gagtgccgat cagtcggatg tgatcgatag tcaagcaagt 960
tccaaagcca gcctggaaca tcagagccac aagtttcaca gccacaagga caagctagtc 1020
ctagacccta agagtaagga agatgatagg tatctgaaat tccgaatttc tcatgaatta 1080
gagagttcat cttctgaggt caactaaaga agaggcaaaa acacagttcc ttactttgca 1140
tttagtaaaa acaagaaaaa gtgttagtga gggttaagca ggaatactaa ctgctcattt 1200
ctcagttcag tggatatatg tatgtagaga aagagaggta atattttggg ctcttagctt 1260
agtctgttgt ttcatgcaaa caccgttgta accaaaagct tctgcacttt gcttctgttg 1320
ttcctgtaca agaaatgcaa cggccactgc attttaatga ttgttattct ttcatgaata 1380
aaatgtatgt agaaataagt aaatttactg aaacaagcaa gaattaaaag agaaactgta 1440
acagtctata tcactatacc cttttagttt tataattagc atatattttg ttgtgattta 1500
ttttttttg ttggtgtgaa taaatcttgt taacg 1535

<210> 12

<211> 1250

<212> DNA

<213> mouse IL-15

<400> 12

cttctgtcca gccactcttc cccagagttc tcttcttcat cctcccctt gcagagtagg 60
gcagcttgca ggtcctcctg caagtctctc ccaattctct gcgcccaaaa gacttgcagt 120
gcatctcctt acgcgctgca gggaccttgc cagggcagga ctgcccccgc ccagttgcag 180
agttggacga agacgggatc ctgctgtgtt tggaaggctg agttccacat ctaacagctc 240
agagaggtca ggaaagaatc caccttgaca catggccctc tggctcttca aagcactgcc 300
tcttcatggt ccttgctggt gaggtcctta agaacacaga aacccatgtc agcagataac 360
cagcctacag gaggccaaga agagttctgg atggatggca gctggaagcc catcgccata 420
gccagctcat cttcaacatt gaagctctta cctgggcatt aagtaatgaa aattttgaaa 480
ccatatatga ggaatacatc catctcgtgc tacttgtgtt tccttctaaa cagtcacttt 540
ttaactgagg ctggcattca tgtcttcatt ttgggctgtg tcagtgtagg tctccctaaa 600
acagaggcca actggataga tgtaagatat gacctggaga aaattgaaag ccttattcaa 660
tctattcata ttgacaccac tttatacact gacagtgact ttcatcccag ttgcaaagtt 720
actgcaatga actgctttct cctggaattg caggttattt tacatgagta cagtaacatg 780
actcttaatg aaacagtaag aaacgtgctc taccttgcaa acagcactct gtcttctaac 840
aagaatgtag cagaatctgg ctgcaaggaa tgtgaggagc tggaggagaa aaccttcaca 900
gagtttttgc aaagctttat acgcattgtc caaatgttca tcaacacgtc ctgactgcat 960
gcgagcctct tccgtgtttc tgttattaag gtacctccac ctgctgctca gaggcagcac 1020
agctccatgc atttgaaatc tgctgggcaa actaagcttc ctaacaagga gataatgagc 1080
cacttggatc acatgaaatc ttggaaatga agagaggaaa agagctcgtc tcagacttat 1140

ttttgcttgc ttatttttaa tttattgctt catttgtaca tatttgtaat ataacagaag 1200

atgtggaata aagttgtatg gatattttat caattgaaat ttaaaaaaaa 1250

<210> 13

<211> 699

<212> DNA

<213> mouse Flt3L gene

<400> 13

atgacagtgc tggcgccagc ctggagccca aattcctccc tgttgctgct gttgctgctg 60

ctgagtcctt gcctgcgggg gacacctgac tgttacttca gccacagtcc catctcctcc 120

aacttcaaag tgaagtttag agagttgact gaccacctgc ttaaagatta cccagtcact 180

gtggccgtca atcttcagga cgagaagcac tgcaaggcct tgtggagcct cttcctagcc 240

cagcgctgga tagagcaact gaagactgtg gcagggtcta agatgcaaac gcttctggag 300

gacgtcaaca ccgagataca ttttgtcacc tcatgtacct tccagcccct accagaatgt 360

ctgcgattcg tccagaccaa catctcccac ctcctgaagg acacctgcac acagctgctt 420

gctctgaagc cctgtatcgg gaaggcctgc cagaatttct ctcggtgcct ggaggtgcag 480

tgccagccgg actcctccac cctgctgccc ccaaggagtc ccatagccct agaagccacg 540

gagctcccag agcctcggcc caggcagctg ttgctcctgc tgctgctgct gctgcctctc 600

acactggtgc tgctggcagc cgcctggggc cttcgctggc aaagggcaag aaggaggggg 660

gagctccacc ctggggtgcc cctcccctcc catccctag 699

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EF1 primer

<400> 14

ctggtaccat gagattggca g 21

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ER1 primer

<400> 15

cctctagatt agttgacctc ag 22

<210> 16

<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 18F1 primer
<400> 16
tgaattcatg gctgccatgt cagaa 25
<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 18R1 primer
<400> 17
ttctagacta actttgatgt aag 23
<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 15F1 primer
<400> 18
tgaattcatg aaaattttga aaccatat 28
<210> 19
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> 15R1 primer
<400> 19
ttctagacta aaagctttgc aaaaactctg tgaag 35
<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FF1 primer
<400> 20

tgaattcatg acagtgctgg cgcc 24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR1 primer

<400> 21

ttctagacta ctgcctgggc cgag 24

<210> 22

<211> 600

<212> DNA

<213> IRES sequence from pCK-mIL12

<400> 22

ggatccgata agcttgatat cgaattccgc cccccccccc cctaacgtta ctggccgaag 60

ccgcttggaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc 120

ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg 180

tctttcccct ctcgccaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc 240

tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaccc 300

cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa 360

ggcggcacaa ccccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct 420

ctcctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccaa aaggtacccc attgtatggg 480

atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgtt tagtccaggt taaaaaaacg 540

tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat aataccatgg 600

600

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IRES-F1 primer

<400> 23

gcggccgcga taagcttgat atcgaattcc g 31

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IRES-R1 primer

<400> 24

ctcgagtatt atcgtgtttt tcaaagg 27